Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

CIRCADIANE ÄNDERUNGEN DER KONZENTRATION DES CYTOSOLISCHEN ANDROGENREZEPTORS DER RATTENPROSTATA IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KONZENTRATION DES PROLAKTINS IM SERUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Dieter Stern
aus Deisslingen

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0072

Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

CIRCADIANE ÄNDERUNGEN DER KONZENTRATION DES CYTOSOLISCHEN ANDROGENREZEPTORS DER RATTENPROSTATA IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KONZENTRATION DES PROLAKTINS IM SERUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Dieter Stern
aus Deisslingen

1986

Dekan: Professor Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Moeller
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Harzmann

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Allgemeine Wirkung der Steroidhormone	1
1.2.	Der Androgenrezeptor und seine Regulation	3
1.3.	Ziel der Arbeit	5
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Chemikalien	6
2.2	Radioaktives Hormon	7
2.3.	Geräte	7
2.4.	Messung der Radioaktivität	8
2.5.	Tiere	8
2.6.	Analyse des Androgenrezeptors	10
2.6.1.	Herstellen der Pufferlösungen	10
2.6.2.	Präparation der Agarplatten	11
2.6.3.	Homogenisierung und Suspendierung des Prostatagewebes	11
2.6.4.	Gewinnung des Cytosols durch Ultrazentrifugation	12
2.6.5.	Inkubation	13
2.6.6.	Separierung des markierten Rezeptors mit der Agargelelektrophorese	13
2.6.7.	Verarbeitung der Gelplatten	14
2.6.8.	Bestimmung der Rezeptormenge	16
2.6.9.	Umrechnung der cpm-Werte in fmol	17
2.7.	DNA-Bestimmung	17
2.8.	Proteinbestimmung	18
2.9.	Bestimmung der Prolaktinkonzentration im Serum	19
2.10.	Statistische Methoden	20

		Seite
3.	Ergebnisse	21
3.1.	Primäre Daten	21
3.2.	Mittelwert, Median und Standardabweichung für die primären Daten	26
3.2.1.	^{3}H-DHT-Rezeptorbindungsstellen	26
3.2.2.	Prolaktinkonzentration im Serum	28
3.2.3.	Proteinkonzentration im Cytosol	30
3.2.4.	DNA-Gehalt der Prostata	30
3.2.5.	Prostatagewicht	32
3.2.6.	Zusammenfassung der primären Ergebnisse	32
3.3.	Gewicht der Tiere	33
3.4.	Abgeleitete Daten	34
3.4.1.	Rezeptorbindungsstellen pro mg Protein	35
3.4.2.	Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA	35
3.4.3.	Rezeptorbindungsstellen pro mg Prostata	35
3.5	Mittelwert, Median und Standardabweichung für die abgeleiteten Daten	39
3.5.1.	Rezeptorbindungsstellen pro mg Protein	39
3.5.2.	Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA	41
3.5.3.	Rezeptorbindungsstellen pro mg Prostata	41
3.5.4.	Zusammenfassung der abgeleiteten Ergebnisse	43
3.6.	Korrelation zwischen den Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA und der Prolaktinkonzentration im Serum	43
4.	Diskussion	45
4.1.	Fragestellung	45
4.2.	Methodik	45
4.2.1.	Lagerung des Prostatagewebes	45
4.2.2.	Homogenisierung und Zusammensetzung der Puffer	45
4.2.3.	Prinzip eines Rezeptorassays	48
4.2.4.	Art der Markierung	49
4.2.5.	Wahl des Liganden	49
4.2.6.	Eigenschaften des DHT	49

		Seite
4.2.7.	Eigenschaften des R 1881	51
4.2.8.	Inkubationsbeginn	52
4.2.9.	Ligandenkonzentration	52
4.2.10.	Inkubationstemperatur	53
4.2.11.	Inkubationsdauer	54
4.2.12.	Separation durch die Agargelelektrophorese	54
4.2.13.	Supprimierung der spezifischen Bindung	56
4.2.14.	Rechnerische Ermittlung der verfügbaren Rezeptorbindungsstellen	58
4.2.15.	Zufällige Fehler bei der Rezeptorbestimmung	58
4.2.16.	Systematische Fehler bei der Rezeptorbestimmung	59
4.2.17.	Strategie des Assays	60
4.2.18.	DNA-Bestimmung	60
4.2.19.	Proteinbestimmung	61
4.2.20.	Wahl der Untersuchungszeitpunkte	61
4.2.20.1.	Prolaktinkonzentration im Serum der männlichen Ratte	61
4.2.20.2.	Latenzzeit einer möglichen Prolaktinwirkung	62
4.3.	Ergebnisse	66
4.3.1.	Prolaktinkonzentration im Serum	66
4.3.2.	Rezeptorbindungsstellen bezogen auf Proteinkonzentration, DNA-Gehalt und Prostatagewicht	67
4.3.3.	Korrelation zwischen den Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA und der Serumprolaktinkonzentration	69
4.4.	Literatur zum Thema	70
4.4.1.	Die Prolaktinwirkung auf die akzessorischen Sexualdrüsen	70
4.4.2.	Wird der Androgenrezeptor durch Testosteron und Prolaktin reguliert?	73
4.4.3.	Problematik der Versuche zur Androgenrezeptorregulation	75
4.5.	Schlußfolgerung	79

		Seite
5.	Zusammenfassung	80
6.	Abkürzungen	81
7.	Literaturverzeichnis	83
	Danksagung	111
	Lebenslauf	112

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Wirkung der Steroidhormone

Die Kontrolle und Integration wichtiger Lebensfunktionen erfolgt bei Säugetieren im wesentlichen durch das Nervensystem und das Endokrinium. Ein koordiniertes Funktionieren dieser komplizierten Systeme wird durch chemische Signalstoffe vermittelt.
Ein spezielles Signal wirkt jedoch nicht auf alle, sondern nur auf bestimmte Zelltypen innerhalb des Organismus, d.h. es wirkt zellspezifisch.
Dies hat zu dem Konzept geführt (Langley 1905, Clark 1933), daß die Erfolgszelle mit Erkennungsmechanismen ausgestattet sein muß, welche es ihr erlauben, zwischen der Vielzahl der im Blutstrom und in der extrazellulären Flüssigkeit zirkulierenden primären Botenstoffen zu unterscheiden.
Die bedeutendsten Substanzen dieser Art sind Neurotransmitter, lokale Mediatoren und Hormone.
Im Falle der Hormone kommt die biologische Wirkung durch Rezeptoren zustande, die je nach Hormonspezies innerhalb der Zelle oder an der Plasmamembran lokalisiert sind. Fehlt der Rezeptor, ist er defekt oder auf andere Art und Weise verändert, so ist das Hormon ohne Einfluß (Gehring und Tompkins 1974, Attardi u.a. 1976).
Entsprechend dem Lokalitäts- und Wirkprinzip lassen sich Membran-, cytoplasmatische und Kernrezeptoren unterscheiden (Levey und Robinson 1982). Diese Rezeptoren sind Proteine, die einerseits das "komplementäre" Hormon spezifisch und mit hoher Affinität binden, andererseits die Funktion besitzen, nach Bindung des Hormons in der Zelle Regulationsprozesse auszulösen (Birnbaumer und O'Malley 1976, Chan und O'Malley 1978).
Neben dem natürlichen Hormon (Karlson 1982) gibt es andere Liganden (Antihormone), die zwar in der Lage sind, den Rezeptor zu besetzen, jedoch keine biologische Aktivität entfalten können (Tezón u.a. 1982, Smith u.a. 1983 a).

Rezeptoren für Steroide sind erstmals von Jensen und Jacobson (1962) am Beispiel der Östrogene beschrieben und von Toft und Gorski (1966) mittels Dichtegradientenzentrifugation charakterisiert worden. Seitdem sind Rezeptoren für alle Steroidhormone in verschiedenen Geweben nachgewiesen worden (Jensen und De Sombre 1972, Liao 1975, Grody u.a. 1982).

In einer Zielzelle finden sich lediglich zwischen 10.000 und 100.000 Rezeptormoleküle (Karlson 1983). Diese kleine Kapazität pro Zelle stellt eines der größten Probleme der Hormonrezeptorforschung dar, da es sehr schwierig ist, die zudem empfindlichen Proteine in nativem Zustand zu isolieren und anzureichern. Nur wenige Rezeptoren sind bisher gereinigt und strukturell näher charakterisiert worden (Westphal und Beato 1980, Van Obberghan und Roth 1981). Wesentliche Aspekte bezüglich Struktur und Funktion der Steroidrezeptoren sind demzufolge auch heute noch spekulativ.

Möglicherweise bestehen die Rezeptorproteine aus mehreren regulatorischen Untereinheiten (Kanazir u.a. 1979, Grody u.a. 1982) und werden wahrscheinlich erst durch eine ATP-abhängige Aktivierung in einen bindungsfähigen Zustand gebracht (Nielsen u.a. 1977, Goueli u.a. 1984).

Die kleinen lipophilen Steroidhormone werden vermutlich durch ein besonderes Transportsystem der Membran in die Zelle eingeschleust (Karlson 1985). Dort verbindet sich das Steroid mit dem Rezeptor, der neuesten Ergebnissen zufolge wahrscheinlich locker mit dem Zellkern assoziiert ist (King und Greene 1984, Welshons u.a. 1984).

Frühere Beobachtungen, wonach der Steroidrezeptor sich im Cytoplasma befindet und erst nach Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern gelangt, sind möglicherweise Artefakte der Präparation (Clark 1984, Beato 1985).

Das bisherige "two step" Modell von Gorski u.a. (1968) und von Jensen und De Sombre (1972) ging davon aus, daß das Steroid im Cytoplasma bereits auf das Rezeptorprotein trifft und der gebildete Steroidhormonkomplex anschließend einem nicht genau definierten allosterischen Konformationswechsel unterliegt, der den Komplex zur Kernwanderung und zur Bindung

an spezifische Stellen am Chromatinapparat befähigt, so daß das Hormon im Kern angereichert wird (Yamamoto und Alberts 1976, Chan und O'Malley 1978).
Dieser Prozess der Transformation (Kovacs u.a. 1983) ist wohlgemerkt hypothetisch, zumal er nur in vitro beobachtet wurde (Bruchovsky u.a. 1975, Sheridan u.a. 1979 und 1981, Grody u.a. 1982).
Durch Aktivierung weniger Gene kommt es zur Neusynthese von m-RNA und zur Bildung spezifischer Proteine bzw. Enzyme (Parker u.a. 1978, O'Malley u.a. 1979).
Der Funktionszustand einer Zielzelle ist nicht nur von der Höhe des aktuellen Hormonspiegels im Blut abhängig, sondern auch von der Anzahl der Hormonrezeptoren und wird eventuell auch durch deren "Ansprechbarkeit" bestimmt (Spelsberg und Halberg 1980).
Welche Mechanismen die Konzentration der Steroidrezeptoren kontrollieren, ist noch unklar. In einigen Fällen scheint die Regulation auf Veränderungen der Rezeptorsynthese bzw. des Rezeptorabbaues zu beruhen (Smith u.a. 1983 b).
Ein Steroidhormon kann in verschiedenen Geweben völlig andere Gene regulieren und wiederum im Lauf der Ontogenese unterschiedliche Gene beeinflussen (Alberts u.a. 1983).

1.2. Der Androgenrezeptor und seine Regulation

Die klassischen Zielorgane der männlichen Sexualhormone sind die akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Es ist daher nicht verwunderlich, daß der Androgenrezeptor zuerst in der Prostata der Ratte entdeckt wurde (Fang u.a. 1969, Mainwaring 1969, Unhjem und Tveter 1969). Aber auch in Muskeln, Knochenmark, Haarfollikeln, Nierengewebe, Uterus, im Gehirn und anderen Organen lassen sich spezifische Androgenbindungsstellen nachweisen (Mainwaring und Mangan 1973, Liao 1975).
Je nach Art des Zielgewebes ist Testosteron oder Dihydrotestosteron der aktive Ligand (Krieg 1976, Mainwaring 1977, Chang und Tindall 1983).

Der Rezeptor der ventralen Rattenprostata ist ein saures Glykoprotein, das bei niedriger Ionenstärke im Dichtegradienten als 8 S Protein sedimentiert, bei "physiologisch höherer" Salzkonzentration jedoch eine 4,5 S Form bildet. Beide Gebilde können ineinander übergehen (Mainwaring 1977). Durch proteolytische Einwirkung entstehen teilweise kleinere Molekülformen, die eine Zusammensetzung aus Untereinheiten vermuten lassen (Wilson und French 1979).
Das Molekulargewicht des mit Affinitätschromatographie hochgereinigten cytosolischen Rezeptors beträgt ca 86.000 Dalton, die Dissoziationskonstante für DHT 6,5 nM (Chang u.a. 1983).
Das Rezeptorprotein läßt sich nicht nur im Cytosol, sondern auch im Kern nachweisen, wobei sogar 80 % der spezifischen Rezeptoren im Nukleus lokalisiert und mit endogenem Hormon gesättigt sind (Blondeau u.a. 1975).
Möglicherweise wird der Rezeptor durch Phosphorylierung erst im Kern bindungsfähig gemacht (Goueli u.a. 1984).
Was mit dem Hormonrezeptorkomplex geschieht, nachdem er im Kern seine Aufgabe erfüllt hat, ist nicht bekannt. Diskutiert wird ein "recycling" zwischen Kern und Cytoplasma (Van Doorn und Bruchovsky 1978, Rossini und Liao 1982) bzw. ein enzymatischer Abbau (Nozu und Tamaoki 1975).

Bezüglich der Regulation des Rezeptors wird angenommen, daß die Anzahl der Rezeptoren vom Androgenspiegel im Blut abhängt (Autoregulation). Dafür sprechen Experimente mit kastrierten Ratten, wobei die Konzentration der Rezeptoren mit dem verminderten Hormonspiegel abfällt, bzw. durch externe Gabe von Testosteron der Rezeptorverlust wieder rückgängig gemacht werden kann (Tezón und Blaquier 1983).
Testosteron induziert bei orchidektomierten Tieren die Neusynthese von Rezeptormolekülen im Kern, die durch Cycloheximid zum größten Teil blockiert werden kann (Blondeau u.a. 1982). Es gibt allerdings auch Befunde, die eine androgenunabhängige Regulation nahelegen.
Sullivan und Strott (1973) sowie Greenstein (1979) zeigten, daß sogar 42 bzw. 56 Tage nach Orchidektomie noch Androgenbindungsstellen nachweisbar bleiben.

In einer Reihe von wissenschaftlichen Arbeiten ist demonstriert worden, daß Prolaktin bei der männlichen Ratte einen fördernden und kontrollierenden Einfluß auf Prostata und Samenblasen ausübt (Grayhack und Lebowitz 1967, Shin u.a. 1974, Hostetter und Piacsek 1977 b).
Über einen "andromimetischen" Effekt des Prolaktins bei der menschlichen Prostata berichteten Jacobi u.a. (1979).
Moeller u.a. (in Vorbereitung) registrierten einen deutlichen Rückgang der Androgenrezeptorkonzentration bei Tieren, die Lisurid - ein prolaktinsenkendes Medikament (Gräf u.a. 1976)- erhielten. Dagegen wurden nach Gabe von Cyproteronacetat, das den Prolaktinspiegel als Nebeneffekt steigert (Bartsch u.a. 1977, Fonzo u.a. 1977), deutlich erhöhte cytosolische Rezeptorwerte in der Rattenprostata ermittelt.
Der Testosteronspiegel war in beiden Experimenten unverändert. Die Autoren vermuten daher, daß Prolaktin bei der männlichen Ratte einen regulierenden Einfluß auf den cytosolischen Androgenrezeptor ausübt. Auch die Funktion der Epiphyse scheint die Konzentration der Androgenrezeptoren zu beeinflussen und das Fortpflanzungsverhalten der Tiere zu steuern (Moeller u.a. 1983 a).

1.3. Ziel der Arbeit

Bei der männlichen Ratte ist für das Serumprolaktin ein circadianer Rhythmus dokumentiert, wobei die höchsten Werte nachts und frühmorgens auftreten (Mattheij und Swarts 1978).
Es wird vermutet, daß Prolaktin den Androgenrezeptor reguliert. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Konzentration der cytosolischen Androgenrezeptoren der Rattenprostata ähnliche tagesabhängige Schwankungen wie Prolaktin aufweist und ob sich eine direkte Korrelation zu den Prolaktinwerten im Serum ermitteln läßt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, stammten die Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt, und besaßen einen Reinheitsgrad von mindestens 98 %.

- Acetaldehyd zur Synthese, Fa. Merck-Schuchardt
- Aceton
- Äthanol, 95 %
- Agar purum, Fa. Behring, Marburg
- Agarose L, Fa. Behring, Marburg
- Ameisensäure p.a., 98-100 %
- Amidoschwarz 10 B
- 2-Desoxy-D-ribose
- Diäthyläther reinst
- 5,5 - Diäthylbarbitursäure - Natriumsalz
- Diphenylamin p.a., Fa. Riedel-de Haen, Seelze
- DL-1,4-Dithioerythrit, Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
- Essigsäure, 100 %
- Isopropanol
- Methanol p.a.
- Methyltrienolon, R 1881, 17ß-Hydroxy-17α-methyl-östra-4-9-11-trien-3-on, Fa. New England Nuclear, Boston, USA
- NADase, NAD^+-Nukleosidase, (E.C. 3.2.2.5.) from Neurospora crassa, 1 Glas ≙ 2,3 mg Protein, 0,91 IU/mg Protein, Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
- Natriumacetat krist. zur Analyse
- Natriumazid
- Natriumhydroxid, Natronlauge, 1 N
- Perchlorsäure, 1 N
- Saccharose, Sucrose, Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
- Salzsäure, 1 N
- Salzsäure, 25 %
- Serumalbumin vom Rind, trocken reinst, Batch A 1003, Fa. Behring, Marburg

- Transferrin, humanes, reinst, Batch, 31171 A,
  Fa. Behring, Marburg
- Trichloressigsäure p.a.
- Tris- (hydroxymethyl) -aminomethan
- Unisolve I, Szintillationsflüssigkeit für wässriges und nicht wässriges Probenmaterial, Fa. Zinsser, Frankfurt

2.2. Radioaktives Hormon

^{3}H-5- α -Dihydrotestosteron
1,2 - ^{3}H (N) - (5-α-Androstan-17ß-ol-3-on)
Spezifische Aktivität 51,6 Ci/mmol
Reinheitsgrad mindestens 95 %,
Fa. New England Nuclear, Boston, Massachusetts, USA

2.3 Geräte

- Analysenwaage, Fa. Sartorius, Göttingen
- Elektrophoresegeräte und Zubehör:
  - Abklatschpapier zur Elektrophorese, Desaga Nr. 146813 23x20 cm und 98x75 mm, Fa. Desaga GmbH, Heidelberg
  - Elektrophoresewanne, Fa. Hölzel, Dorfen, Obb.
  - Gießform zum Plattengießen, dto.
  - Kühlapparatur, Typ UKT, Fa. Bühler, Tübingen
  - Netzanschlußgerät 121280, Fa. Desaga GmbH, Heidelberg
- Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml, Eppendorf Gerätebau, Fa. Netheler u. Hinz, Hamburg
- Eppendorf Pipetten dto.
- Gelplattenschneidegerät, Fa. Hölzel, Dorfen, Obb.
- Glasplattenstanzgerät, dto.
- Glasplatten 100x85x0,7 mm
- Heizplatte, Typ RCH, Fa. Janke und Kunkel KG, Staufen
- Homogenisator (Potter-), Typ RM 14, dto.
- Mikrodismembranator, Typ 853067, Fa. Braun, Melsungen
- pH-Meßgerät, pH-Meter Digi 88, Fa. Wissenschaftliche Technische Werkstätten, Weilheim

- Rotlichtlampe, 100 Watt und Dimmer, Leihgabe Dipl.Phys. Wolfgang Daunke, Tübingen
- Rührgerät IKA Combimag RCO, Fa. Janke und Kunkel KG, Staufen
- Scintillation Counter, Model BF 5003 A, Betascint, Fa. Berthold, Bad Wildbad
- Spektralphotometer M4 Q III, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen
- Szintillationszählröhrchen -Zinsser- Polyvials R 174, Fa. Zinsser, Frankfurt
- Ultramikropipette 5 ml, Oxford Laboratories, Fa. Kontern Technik, Eching
- Ultrazentrifuge mit Zubehör, Fa. Beckman Instruments, München
  - Festwinkelrotor Typ 70.1 TI, Serie No E 14108
  - Ultrazentrifuge Spinco L5-65 B
  - Ultrazentrifugenröhrchen, Polykarbonat
- Vortexer, Typ Reax I, Fa. Heidolph KG, München
- Wasserstrahlpumpe, Fa. Bachhofer, Reutlingen
- Zelluloseacetat-Folie, Membranfolie, Katalog Nr. 11200, Fa. Sartorius, Göttingen
- Zentrifuge, Typ UJ 2, Fa. M. Christ, Osterode
- Zentrifuge, Typ UJ 35, dto.
- Zentrifugenröhrchen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht

2.4. Messung der Radioaktivität

Der verwendete Betacounter besitzt eine effektive Zählrate von 64 % bei einem Grundrauschen von 16 cpm.
Für alle Proben wurde Unisolve I als Szintillationsflüssigkeit verwendet.

2.5. Tiere

Alle Versuche wurden mit männlichen Auszuchtratten vom Wistar-Stamm durchgeführt. Die Tiere stammten von der Fa. Ivanovas, Kisslegg und waren bei der Lieferung 60 Tage alt.

Sie wurden in einem klimatisierten Tierstall jeweils zu dritt pro Käfig gehalten und mit Standardpelletfutter (Rattenfutter Alma H 1003, Fa. Botzenhard KG, Kempten) und Wasser ad libitum versorgt. Von 7.30 Uhr bis 19.30 Uhr war der Raum beleuchtet und die folgenden 12 Stunden dunkel.
Zehn Tage lang konnten sich die Ratten an diesen Hell-Dunkel-Rhythmus anpassen. Damit sich die Tiere auch an den Experimentator gewöhnten, wurden sie in dieser Zeit häufig aus ihrem Käfig herausgenommen und nach kurzer Zeit wieder sanft dorthin zurückgebracht. Einen Tag vor Versuchsbeginn variierte ihr Gewicht zwischen 205 und 240 Gramm. Sie wurden in vier Versuchsgruppen zu je zehn Tieren eingeteilt und zu verschiedenen Tageszeiten durch rasches Dekapitieren nach folgendem Schema getötet:

Gruppe	Zeit	Beleuchtung
1	1,15 Uhr	dunkel
2	7,00 Uhr	dunkel
	7,30 Uhr	Einschalten des Lichtes
3	8,00 Uhr	hell
4	9,30 Uhr	hell

"Rasch" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Zeit zwischen der Entnahme aus dem Käfig und dem Töten maximal 15 Sekunden betrug. Um die anderen Tiere nicht unnötigem Streß auszusetzen, wurde jedes überflüssige Geräusch vermieden, aber schnell und zielstrebig gearbeitet.
Nach dem Dekapitieren wurde das Blut des Körperstammes der Tiere mit Hilfe heparinisierter Trichter getrennt in vorbereiteten Zentrifugenröhrchen aufgefangen.
Das Töten und Ausbluten erfolgte der Reihe nach und dauerte 20 bis 25 Sekunden pro Tier, bzw. 4 Minuten für eine ganze Gruppe.
Während der Dunkelphase wurde mit einer Rotlichtlampe und einem Dimmer bei niedriger Helligkeitsstufe gearbeitet, da Ratten Licht dieser Wellenlänge nicht wahrnehmen können (Mattheij und Swarts 1978).

Anschließend wurde der Oberbauch der Tiere mit einem Längsschnitt eröffnet, den man ypsilonförmig in beide Leisten erweiterte. Die ventralen Prostatalappen wurden nun sorgfältig aus ihrer zarten Bindegewebskapsel herauspräpariert, vom dorsalen Prostatagewebe abgetrennt, in Eppendorf-Reaktionsgefäße eingefüllt und sofort mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden sie bei -70°C gelagert.
Die mit ca 5 ml Blut gefüllten Zentrifugenröhrchen ließ man 3 Stunden bis zur vollständigen Gerinnung in Eiswasser stehen. Danach wurde der Blutkuchen mit einem Holzstäbchen vorsichtig von der Wand des Zentrifugenröhrchens gelöst und das Blut 10 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Rehfeld und Reichelt 1973).
Das gewonnene Serum wurde eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

2.6. Analyse des Androgenrezeptors

2.6.1. Herstellen der Pufferlösungen

Michaelis-Puffer 0,08 M
0,2 mol 5,5 - Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz, 0,2 mol krist. Natriumacetat und 0,01 mol Natriumazid wurden in einem 5 Liter-Meßkolben in etwa 4,8 Liter Aqua dest. aufgelöst. Die Lösung wurde auf ca 4°C abgekühlt, mit 1 N HCL auf ein pH von 8,2 eingestellt und mit Aqua dest. unter Kontrolle des pH auf 5 Liter aufgefüllt.

Tris-Puffer 0,01 M
0,05 mol Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und 0,025 mol Natriumazid wurden in einem 5 Liter-Glaskolben zur Lösung gebracht. Nach dem Abkühlen auf ca 4°C fügte man 25 % HCL hinzu, bis ein pH von 7,5 erreicht war und füllte dann mit Aqua dest. bis zur Marke auf.

Dithioerythrit - Sucrose - Tris-Puffer (DST),
0,05 M - 0,25 M - 0,01 M

5 mmol Dithioerythrit und 25 mmol Sucrose löste man in 100 ml Tris-Puffer auf.

2.6.2. Präparation der Agarplatten

a) Beschichtung der Glasplatten:
Glasplatten der Größe 100x85x0,7 mm wurden mit Methanol entfettet und bei 100°C im Trockenschrank getrocknet. 100 mg Agar purum wurden in 200 ml Aqua dest. gelöst und bis zum Sieden erhitzt.
Von dieser heißen Agarlösung trug man je 7 ml gleichmäßig auf die Glasplatten auf. Die horizontal beschichteten Glasplatten wurden anschließend bei 100°C getrocknet. Nach dem Abkühlen bewahrte man die Platten kühl und trocken auf.

b) Gießen der Glasplatten:
1,10 g Agar purum
0,12 g Agarose L
68 ml Michaelis-Puffer
67 ml Aqua dest.
erhitzte man unter Rühren bis zur Transparenz. Zwei beschichtete Glasplatten, die sich in einer exakt waagerecht stehenden Plexiglasform befanden, wurden mit dieser Lösung überschichtet. Nach dem Gelieren wurden diese 5 mm dicken Agarplatten im Kühlraum maximal 24 Stunden aufbewahrt.

2.6.3. Homogenisierung und Suspendierung des Prostatagewebes (Moeller u.a. 1983 b)

Die tiefgefrorene Prostata wurde zunächst gewogen und danach in eine vorgekühlte Teflonkapsel gegeben, die lose eine Wolframkarbidkugel von 10 mm Durchmesser enthielt. Nachdem man eine Minute in flüssigem Stickstoff gekühlt hatte, spannte man die Teflonkapsel in die Haltevorrichtung des Mikrodismembranators ein, der wie eine Kugelmühle arbeitet, und homogenisierte

das Gewebe 3x30 Sekunden lang bei einer Schüttelfrequenz von 50 Hz.
Damit sich das Gewebe nicht über 0°C erhitzen konnte, kühlte man die Teflonkapsel zwischen den Schüttelvorgängen jeweils für eine Minute in flüssigem Stickstoff. Bei ca 4°C wurde das feine Gewebepulver nun sorgfältig von den Wänden der Kapsel abgelöst und mit 400 µl DST-NADase-Puffer pro 100 mg Gewebe versetzt.
Um die Verstoffwechselung des später hinzuzufügenden Dihydrotestosterons zu verhindern, war dem Puffer NADase in einer Konzentration von 0,8 IU/ml Puffer zugefügt worden. NADase zerstört die Pyrimidinnukleotide, die bei der Hydrierung von Dihydrotestosteron zu Androstandiolen eine große Rolle spielen (Moeller 1982, S. 62).
Unter vorsichtigem Anwärmen mit der Hand taute das Gewebepulver bei gleichzeitigem Rühren der Pufferlösung auf. Die Suspension wurde vorsichtig unter Vermeidung von Blasenbildung 5x in die Spitze einer 1000 µl Eppendorfpipette aspiriert, dadurch homogenisiert und danach in ein vorgekühltes Zentrifugenröhrchen aus Polykarbonat pipettiert.

2.6.4. Gewinnung des Cytosols durch Ultrazentrifugation

Die Prostatagewebssuspension zentrifugierte man in der Ultrazentrifuge mit vorgekühltem Rotor eine Stunde lang bei 0°C und 40.000 rpm, um zertrümmerte Zellorganellen abzutrennen. Anschließend wurde der 100.000 g Überstand, der dem Cytosol entspricht, vorsichtig mit Spritze und Lumbalkanüle entnommen, wobei darauf geachtet wurde, daß die oben schwimmende Lipidschicht belassen und der Niederschlag unten im Röhrchen nicht aufgerührt wurde.
Das gewonnene Cytosol wurde zur Proteinbestimmung und zur Analyse des Androgenrezeptors eingesetzt, den Niederschlag verwendete man zur DNA-Bestimmung.

2.6.5. Inkubation

Um den Androgenrezeptor mit radioaktivem Hormon zu markieren, wurden bei 4°C zwei Parallelansätze nach folgendem Muster pipettiert:

Nicht-supprimierter Ansatz Ansatz 1	Supprimierter Ansatz Ansatz 2
10 µl Tris-Puffer	10 µl R 1881 $4x10^{-5}$M
10 µl ^{3}H DHT $4x10^{-7}$M	10 µl ^{3}H DHT $4x10^{-7}$M
100 µl Cytosol	100 µl Cytosol
80 µl DST-NADase-Puffer	80 µl DST-NADase-Puffer
Summe: 200 µl Inkubat	Summe: 200 µl Inkubat

Die Ansätze blieben 24 Stunden bei 4°C im Dunkeln stehen.

2.6.6. Separierung des markierten Rezeptors mit der Agargelelektrophorese

Der ^{3}H-DHT-Rezeptorkomplex wurde mit der Agargelelektrophorese bei niedriger Temperatur nach Wagner (1972) von freiem und unspezifisch gebundenem ^{3}H-DHT abgetrennt.
Die Geräte für die Elektrophorese sind von Wagner (1978) genau beschrieben worden.
Unmittelbar vor Beginn der Elektrophorese schnitt man die Agarplatten aus der Gießform heraus und stanzte parallel zur kleinen Kantenlänge in der Mittellinie 10 Stanzlöcher zur Aufnahme der Proben (Durchmesser 3,6 mm, Abstand 9 mm). Die Stanzmarken wurden mit Pasteurpipette und Wasserstrahlpumpe leergesaugt.

Dann plazierte man die Agarplatten so auf dem Kühlblock des Elektrophoresegerätes, daß das elektrische Feld senkrecht zur Reihe der Startlöcher wirkte. Als Ionenbrücken wurden gefaltete Filterpapiere verwendet; Michaelis-Puffer diente als Elektrodenlösung.
Damit Verluste durch Seitdiffusion vermieden wurden, beschickte man jeweils 3 benachbarte Startlöcher mit je 50 µl des gleichen Inkubats, und zwar Bahn 2-4 mit Ansatz 1, sowie Bahn 7-9 mit Ansatz 2.
Die Randlöcher und die beiden mittleren Bahnen der Gelplatte blieben frei.
Nach dem Pipettieren der Proben begann man sofort mit der Elektrophorese, die im Kühlraum bei einem konstanten Strom von 90 mA pro Platte durchgeführt wurde. Die Laufzeit betrug 2 Stunden.
Der Kühlblock wurde mit Isopropanol auf -2°C gekühlt. Während der Elektrophorese stieg die Temperatur der Agarplatten auf ca 1°C an. Der elektrische Widerstand der Elektrophoreseanordnung, von dem die Bildung der Joule'schen Wärme abhängt, lag bei 1300 Ohm.

2.6.7. Verarbeitung der Gelplatten

Nachdem die Elektrophorese beendet war, wurden die Flüssigkeitsreste in den Startlöchern abpipettiert. Man entfernte dann die überhängenden Randstreifen, nahm die Gelplatte vom Kühlblock weg und spannte sie in die Halterung des Gelschneidegerätes ein, wobei die anodische Seite nach vorne zeigen mußte.
Das Gel wurde zunächst in 10 Längsbahnen parallel zur Feldrichtung, dann, von der anodischen Kante beginnend, in 26 Fraktionen zu 3 mm Breite senkrecht zur Feldrichtung geschnitten. Von der Anodenseite ausgehend wurden die Fraktionen fortlaufend durchgezählt, so daß das Startloch jeder Bahn zwischen die Fraktionen 13 und 14 zu liegen kam. Nur die Gelstückchen der mittleren Bahnen (3 und 8) wurden nach einem bestimmten Muster in Betazählgefäße gegeben.

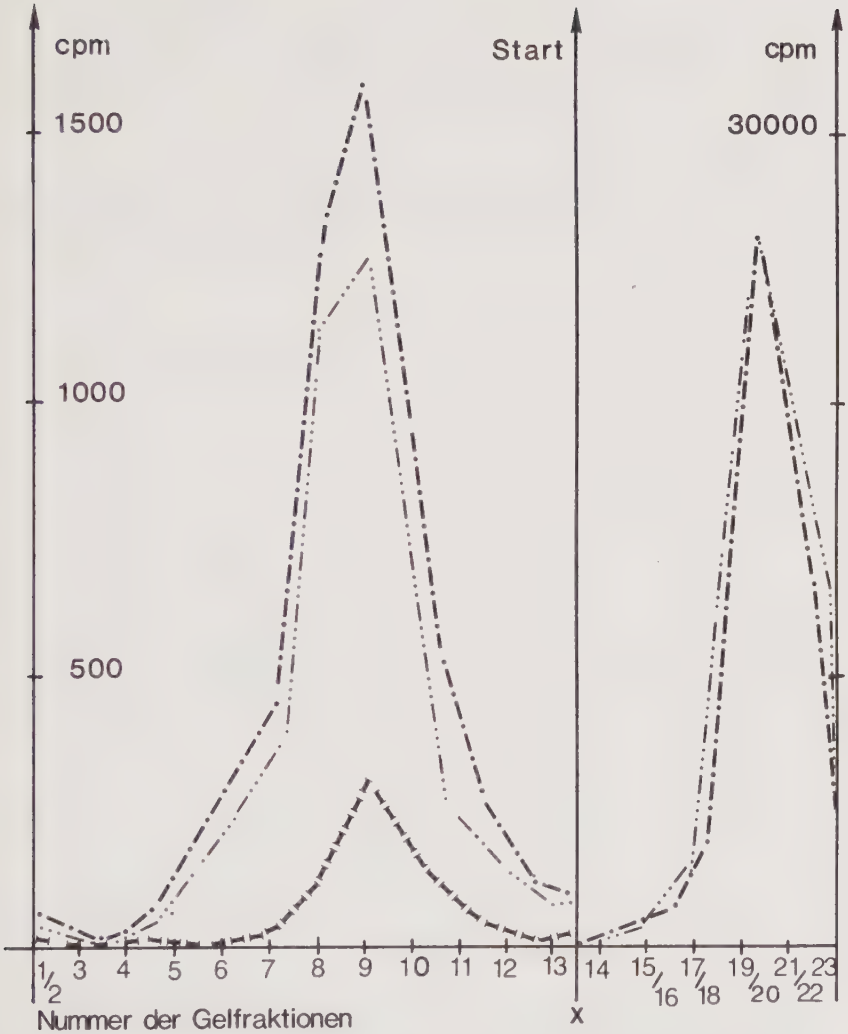

Abb. 1 Fraktionierung der Agargelplatten nach der Elektrophorese. ·—· Ansatz 1: nicht supprimiert, ···—··· Ansatz 2: supprimiert, – – – Supprimierte Bindung.

Dabei ermittelte man, mit Ausnahme von Gelfraktion 1 und 2, auf der anodischen Seite die Radioaktivität jeder Fraktion einzeln, während die kathodischen Fraktionen ab Nummer 14 jeweils zu zweit in ein Zählröhrchen eingefüllt und gemessen wurden (vgl. Abb. 1).
Anschließend füllte man in jedes Betazählgefäß 10 ml Szintillationsflüssigkeit und schüttelte die Gefäße mehrmals. Nach 24 Stunden wurde die Radioaktivität der Gelstückchen im Betacounter gemessen.
Gleichzeitig bestimmte man die Radioaktivität der im Startloch zurückgebliebenen Flüssigkeitsmenge (siehe oben) und von 50 µl Inkubationslösung.

2.6.8. Bestimmung der Rezeptormenge

Da durch die Agargelelektrophorese der radioaktiv markierte Androgenrezeptor nicht vollständig vom unspezifisch gebundenen Hormon abgetrennt wird (Moeller 1982), führte man die Elektrophorese mit einem "normalen" und einem "supprimierten" Ansatz durch, bei dem selektiv die spezifische Bindung durch ein hundertfaches Überangebot an nicht radioaktivem Hormon unterdrückt wurde (Chamness und Mc Guire 1975).
Zur Auswertung wurden die in jeder Gelfraktion gemessenen Radioaktivitätswerte wie in Abbildung 1 aufgezeichnet.
An der Abszisse wurden die einzelnen Gelfraktionen von 1 bis 26 aufgetragen, die Ordinate gab die ermittelte Radioaktivität in counts per minute (cpm) an.
Auf der anodischen Seite (Fraktion 1-13) ergab sich für den "normalen" Ansatz der Peak A_1, auf der kathodischen Seite (Fraktion 14-26) der Peak B_1.
Entsprechend erhielt man für den "supprimierten" Ansatz die Spitzen A_2 und B_2. Die im Startloch zurückgebliebenen Reste wurden als X_1 bzw. X_2 bezeichnet.
Da das rezeptorgebundene Hormon im anodischen Gipfel enthalten ist, ergibt sich die spezifische Bindung durch einfache Subtraktion:

von dem anodischen Peak des Normalansatzes wird der entsprechende Peak des supprimierten Ansatzes abgezogen: $\Delta = A_1 - A_2$. Verlässlichere Werte erhält man, wenn die Korrekturformel nach Oettling (in Vorbereitung) angewandt wird: $\Delta_{korr} = A_1 - A_2 \times \frac{B_1}{B_2}$. Alle Werte sind daher nach dieser Formel ermittelt, wobei der anodische Peak A_2 des supprimierten Ansatzes mit dem Quotienten der Kathodenpeaks B_1 und B_2, die das überschüssige, freie Hormon enthalten, korrigiert wird.

2.6.9. Umrechnung der cpm-Werte in fmol

Berücksichtigt man die effektive Zählrate des Betacounters, die Definition der Einheit Curie und die spezifische Aktivität des radioaktiven Hormons, so kann man aus den cpm-Werten die Menge an radioaktivem Hormon berechnen:

$$1 \text{ cpm} \;\hat{=}\; \frac{100}{64} \text{ dpm}$$

$$1 \text{ Ci} \;\hat{=}\; 2{,}22 \times 10^{12} \text{ dpm}$$

$$51{,}6 \text{ Ci} \;\hat{=}\; 10^{-3} \text{ mol DHT}$$

$$1 \text{ cpm} \;\hat{=}\; \frac{10^{-12} \times 10^{-3} \text{ mol}}{0{,}64 \times 2{,}22 \times 51{,}6} = 0{,}01364 \text{ fmol DHT}$$

2.7. DNA-Bestimmung (Wagner und Gaues 1972)

Für die DNA-Bestimmung wurde der bei der Ultrazentrifugation entstandene Niederschlag zweimal mit je 1 ml Tris-Puffer gewaschen und als ganzes zusammen mit 3 ml Tris-Puffer bei -20° eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Material mit einem Homogenisator nach Potter und Elvehjem aufbereitet und so eine wässrige Suspension erzeugt. In einem vorgekühlten Zentrifugenröhrchen wurden dann 2 ml dieses Homogenats mit 5 ml kalten Äthanols versetzt und 10 Minuten im Eisbad gerührt.

Um die dabei ausgefällte DNA abzutrennen, zentrifugierte man anschließend im Kühlraum 10 Minuten bei 4000 Upm. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde der Überstand abgesaugt und verworfen, während das Sediment nochmals in gleicher Weise mit Alkohol behandelt wurde. Im Anschluß an die Resuspendierung wurde erneut zentrifugiert (s.o.). Zu dem Niederschlag gab man jetzt 5 ml eines gekühlten Äthanol-Äthergemisches (1:2, Vol) hinzu, rührte die Lösung wieder 10 Minuten lang bei 0°C, zentrifugierte (s.o.) und wiederholte nochmals den gesamten Arbeitsgang. Den noch feuchten Niederschlag ließ man im Exsikkator nicht ganz bis zur Vollständigkeit trocknen, setzte 2,5 ml 0,5 N Perchlorsäure zu und rührte die Suspension bis sich der größte Teil gelöst hatte. Anschließend erhitzte man im Wasserbad für 30 Minuten auf 80°C, wobei jedes Zentrifugenröhrchen mit einer Glaskugel bedeckt wurde, um ein Verdampfen zu vermeiden. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand in einen 5 ml Kolben eingefüllt, das Sediment ein zweitesmal mit 2,5 ml 0,5 N Perchlorsäure versetzt und erneut 30 Minuten in das 80°C heiße Wasserbad gebracht.
Die Überstände vereinigte man und verdünnte mit 0,5 N Perchlorsäure auf 5 ml.
Danach wurde 1 ml dieser Lösung zu 2 ml des 1,5 %-igen (w/v) Diphenylreagenz (Burton 1956) pipettiert und gut vermischt. Den Ansatz ließ man ca 16-18 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen und bestimmte dann die Extinktion der blauen Lösung bei 600 nm. Anstelle von DNA wurde 2-Desoxy-D-ribose als Standard verwendet. Als Leerwert benützte man 0,5 N Perchlorsäure zusammen mit dem Farbreagenz. Die Standardkurve war im Bereich von 0,25 µg-16µg linear.

2.8. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Cytosol-Proteins erfolgte nach einer von Schaffner und Weismann (1973) beschriebenen Methode, die jedoch in modifizierter Form angewandt wurde (Moeller 1982, S.8).

Pro Versuch verdünnte man 20 µl Cytosol mit 40 µl Tris-Puffer. Von dieser Lösung wurden 2x5 µl mit einer Oxfordpipette auf Zelluloseacetatfolie pipettiert. Man erhielt Flecke von ca 0,8 mm Durchmesser, die an der Luft getrocknet wurden. Bis zur Analyse bewahrte man die Papierstreifen trocken auf.
Die Folie wurde dann in einer Plastikwanne 10 Minuten lang mit 0,1 %-iger Amidoschwarz 10 B-Lösung (in Methanol, Eisessig, Aqua dest; 45:10:45, Vol %) bedeckt.
Zur Entfärbung des "Hintergrundes" wurden die Folien dreimal für je 3 Minuten mit einer Entfärbelösung (Methanol, Eisessig, Aqua dest; 90:2:8, Vol %) gewaschen. Die noch blau gefärbten Proteinflecke wurden ausgeschnitten, zerknüllt und in Eppendorf-hütchen mit je 1 ml Verflüssigungslösung (Ameisensäure, Eisessig, Trichloressigsäure; 80:10:10, Vol %) versetzt.
Man ließ die Ansätze 24 Stunden im Dunkeln stehen, bis die Folie beinahe verflüssigt war. Durch Vortexen wurde die Folie und der blaue Protein-Farbstoff-Komplex vollständig aufgelöst. Die Extension der Lösung wurde bei 620 nm gemessen. Als Leerwert diente gleich behandelte Folie, auf die 5 µl eines DST-Tris-Puffergemisches (1:2, Vol) gegeben worden waren. Die Eichkurve, hergestellt mit Rinderserumalbumin und Humantransferrin, war im Bereich von 5-25 µg linear. Tris-Puffer und Thiolverbindungen stören den Assay nicht (Schaffner und Weismann 1973).

2.9. Bestimmung der Prolaktinkonzentration im Serum

Die Konzentration des Serum-Prolaktins wurde mit dem Radioimmunoassay nach dem "Rat Pituitary Hormone Distribution Program" des National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases in den Laboratorien der Firma Schering, Berlin, bestimmt. Das Bestimmungsverfahren beruht auf einer Doppel-Antikörpertechnik und richtet sich nach den Empfehlungen des NIAMDD (Niswender u.a. 1969).
Die Ergebnisse sind in ng/ml ausgedrückt, als Standardsubstanz wurde Rat Prolaktin-RP1 des NIAMDD verwendet.

2.10. Statistische Methoden

Die Ergebnisse wurden mit der einfachen Varianzanalyse, dem H-Test von Kruskal und Wallis, bzw. unter Zuhilfenahme des Scheffé-Testes auf Signifikanz überprüft (Sachs 1978).
Zur Ermittlung einer Korrelation zwischen den untersuchten Größen wurde der Rangkorrelationskoeffizient von Spearman benützt.

3. Ergebnisse

Auf Grund methodischer Fehler konnten nicht alle durchgeführten Versuche gewertet werden. Als Kriterium für die Qualität der Versuche diente ein Vergleich zwischen der Gesamtradioaktivität des nicht supprimierten Ansatzes 1 und des supprimierten Ansatzes 2.
Die Radioaktivitätsunterschiede wurden nach Abschluß der Elektrophorese aus den Agargelstückchen ermittelt und zeigen Pipettierfehler auf. Versuche, bei denen der Quotient $A_1 + B_1 + X_1 : A_2 + B_2 + X_2$ im Bereich von 0,94 - 1,06 lag, wurden als genügend zuverlässig angesehen.

3.1. Primäre Daten

Erläuterungen zu den folgenden Tabellen:

A) Kennzeichnung des Versuchs
B) Cytosol-Menge in µl
C) Prostatagewicht in mg
D) Protein in µg pro 50 µl Cytosol
E) DNA-Gehalt pro Prostata in µg
F) Prolaktin im Serum in ng/ml
G) Korrigierte supprimierbare Bindung in cpm pro 50 µl Inkubat
H) Korrigierte supprimierbare Bindung in fmol pro 50 µl Inkubat ≙ ^{3}H-DHT-Rezeptorbindungsstellen

TABELLEN

TABELLE 3.1.1. GRUPPE 1 ZEIT 1^{15}

A	B	C	D	E	F	G	H
1.1	480	117	480	210	37	20	0,27
1.2	620	154	500	410	156	34	0,46
1.3	480	120	560	255	191	51	0,70
1.4	560	140	710	420	45	91	1,24
1.5	740	183	500	510	400	173	2,36
1.6	650	161	510	495	160	260	3,55
1.7	680	168	590	460	69	373	5,09

TABELLE 3.1.2. GRUPPE 2 ZEIT 7°°

A	B	C	D	E	F	G	H
2.1	550	132	487	375	55	21	0,29
2.2	440	110	536	450	215	120	1,64
2.3	460	114	435	263	55	322	1,66
2.4	600	150	516	300	63	300	4,09
2.5	650	158	521	405	400	413	5,63
2.6	630	150	540	472	278	700	9,55
2.7	630	155	619	410	290	732	9,98

TABELLE 3.1.3. GRUPPE 3 ZEIT 8°°

A	B	C	D	E	F	G	H
3.1	500	120	488	263	60	107	1,46
3.2	530	126	461	341	17	136	1,85
3.3	500	115	427	255	32	215	2,93
3.4	660	163	427	390	31	249	3,37
3.5	750	183	490	420	25	330	4,50
3.6	620	151	500	390	37	330	4,50
3.7	560	135	536	457	400	414	5,65

TABELLE 3.1.4. GRUPPE 4 ZEIT 9^{30}

A	B	C	D	E	F	G	H
4.1	840	210	489	506	15	0	0
4.2	580	139	551	345	31	18	0,25
4.3	540	128	600	300	400	33	0,45
4.4	860	215	529	592	51	93	1,27
4.5	720	174	517	525	22	103	1,40
4.6	800	200	487	532	37	134	1,83
4.7	880	218	532	431	48	199	2,71
4.8	820	205	881	442	40	206	2,81
4.9	860	208	512	592	33	244	3,33

3.2. Mittelwert, Median und Standardabweichung für die primären Daten

3.2.1. ^{3}H-DHT-Rezeptorbindungsstellen

	Gruppe 1 1^{15}	Gruppe 2 $7^{\circ\circ}$	Gruppe 3 $8^{\circ\circ}$	Gruppe 4 9^{30}	
$\bar{x}$	2,0	4,7	3,5	1,6	"
$\tilde{x}$	1,2	4,1	3,4	1,4	fmol
s	1,8	3,9	2,0	1,2	"
n	7	7	7	9	

Die gemessenen Rezeptorwerte zeigen ein Maximum bei $7^{\circ\circ}$ und lassen erkennen, daß die Werte unmittelbar vor und nach dem Einschalten des Lichtes etwas höher sind als sonst (vgl. Abb. 2).

Exakte Aussagen lassen sich jedoch nur machen, wenn man die Rezeptorwerte auf Protein, DNA oder das Prostatagewicht bezieht (siehe 3.4.).

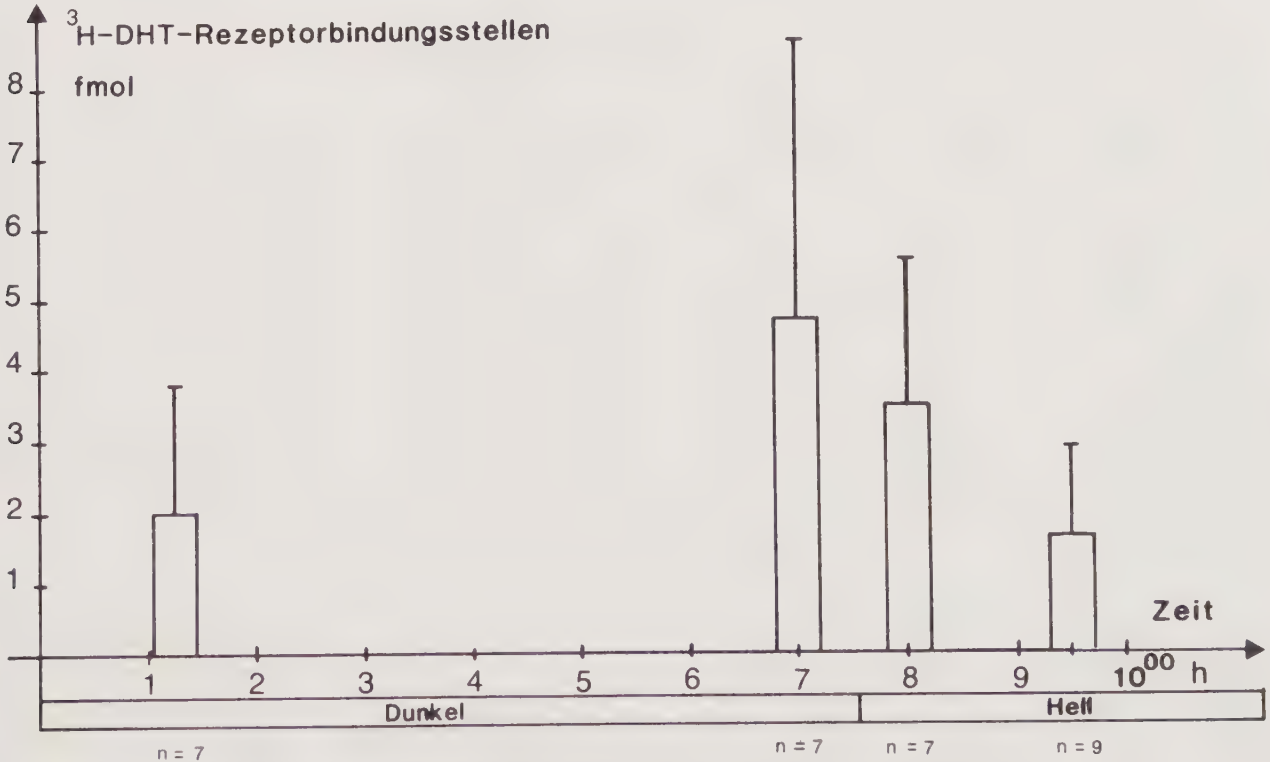

Abb. 2 Konzentration der Rezeptorbindungsstellen im Inkubat, $\bar{x}$+s.

3.2.2. Prolaktinkonzentration im Serum

	Gruppe 1 1^{15}	Gruppe 2 7^{00}	Gruppe 3 8^{00}	Gruppe 4 9^{30}	
$\bar{x}$	110	194	34	35	"
$\tilde{x}$	156	215	31,5	35	ng/ml
s	67	138	15	12	"
n	6	7	6	8	

Nach einem statistischen Verfahren von Dixon (1950, 1953) sind die Werte > 400 der Tabellenreihen H in Gruppe 1 mit 95 % und in den Gruppen 3 und 4 mit 99 % Wahrscheinlichkeit als Ausreißer anzusehen, und deshalb bei der Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen unberücksichtigt geblieben (Sachs, S. 219).

In der Gruppe 2 darf dieser Wert nicht als Extremwert eliminiert werden.

Die Prolaktinwerte sind in der Dunkelphase deutlich höher als während der Lichtperiode. Um 7^{00}, kurz vor Beginn der Helligkeitsphase, findet sich ein deutliches Maximum. Auch die Standardabweichung ist am Zeitpunkt 7^{00} sehr groß. Sie liegt jedoch noch außerhalb des Streubereiches der Werte um 8^{00} und 9^{30} (vgl. Abb. 3).

Die einfache Varianzanalyse und der Scheffé-Test zeigen deutliche Signifikanzunterschiede an (Gruppen 2/3, $p = 0{,}01$ bzw. Gruppen 2/4, $p = 0{,}0069$).

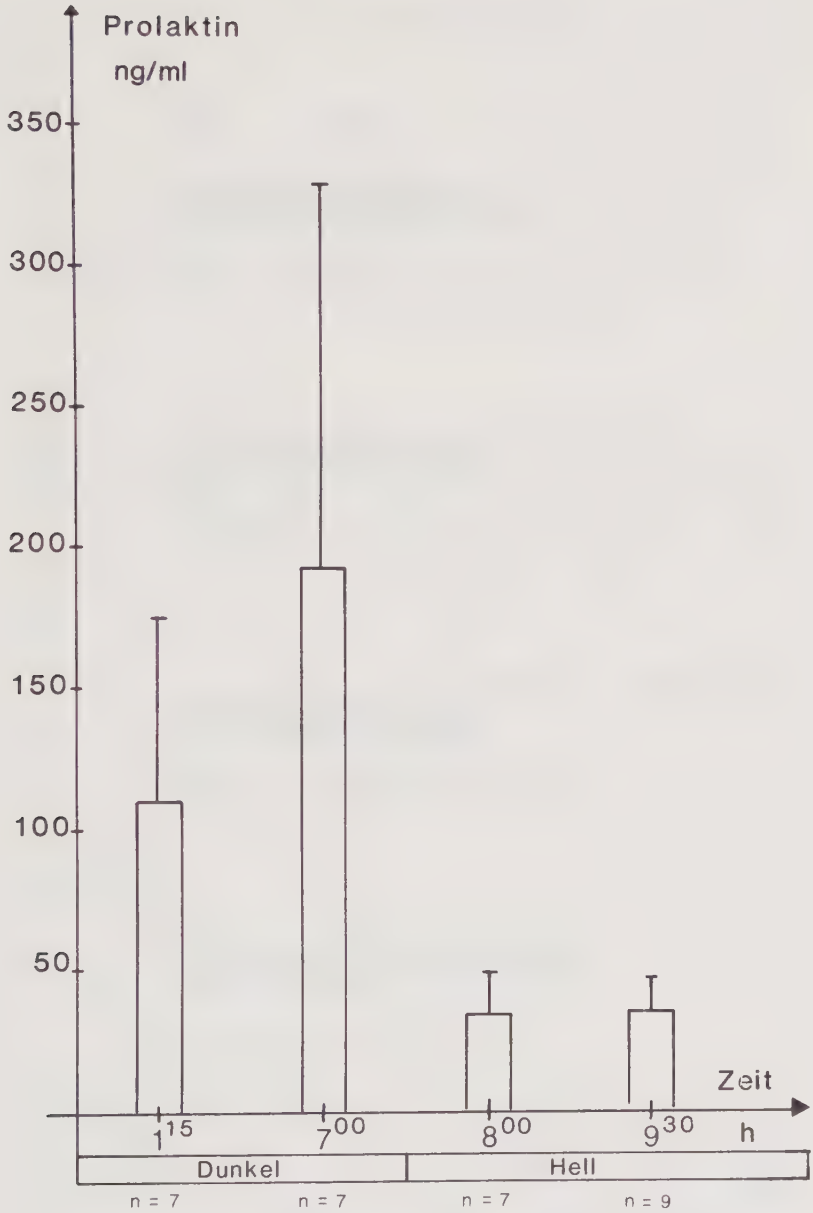

Abb.3 Prolaktinkonzentration im Serum, $\bar{x}$+s.

3.2.3. Proteinkonzentration im Cytosol

	Gruppe 1 1^{15}	Gruppe 2 7^{oo}	Gruppe 3 8^{oo}	Gruppe 4 9^{30}	
$\bar{x}$	551	522	476	527	"
$\tilde{x}$	510	521	488	523	µg/50µl
s	81	56	41	36	"
n	7	7	7	8	

In der Gruppe 4 wird der Wert 881 der Reihe D mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % als Ausreißer angesehen (Sachs S. 219). Diese Werte sind zufällig verteilt, statistisch findet man keine Unterschiede (Varianzanalyse p = 0,20).

3.2.4. DNA-Gehalt der Prostata

	Gruppe 1 1^{15}	Gruppe 2 7^{oo}	Gruppe 3 8^{oo}	Gruppe 4 9^{30}	
$\bar{x}$	394	382	363	474	"
$\tilde{x}$	420	405	390	506	µg
s	116	76	77	103	"
n	7	7	7	9	

Die Werte der Gruppen 1 und 4 sind geringfügig größer als in den beiden anderen Gruppen. Auch hier ergeben statistische Methoden keine signifikanten Befunde (Varianzanalyse p = 0,10).

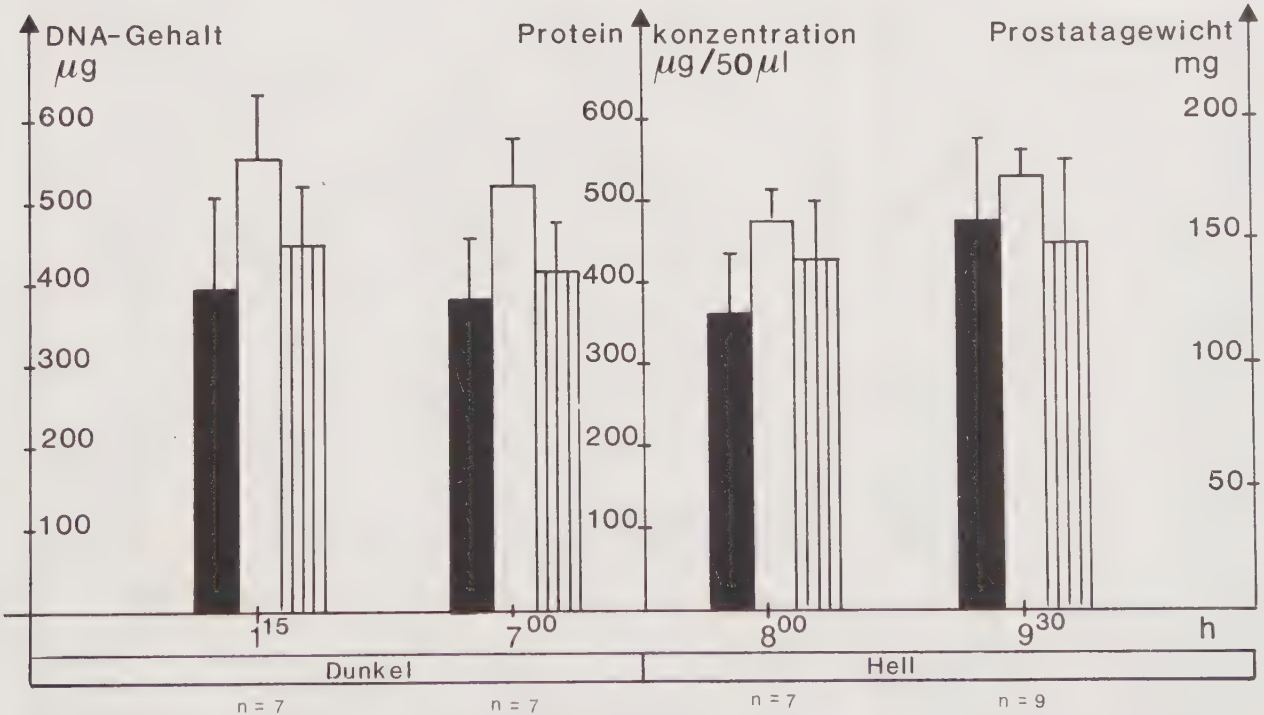

Abb.4 DNA-Gehalt der Prostata (schwarz), Proteinkonzentration im Cytosol (weiß) und Prostatagewicht (schraffiert), $\bar{x}+s$.

3.2.5. Prostatagewicht

	Gruppe 1 1^{15}	Gruppe 2 7^{oo}	Gruppe 3 8^{oo}	Gruppe 4 9^{30}	
$\bar{x}$	149	138	142	149	"
$\tilde{x}$	154	150	135	154	mg
s	25	20	25	34	"
n	7	7	7	9	

Hier sind die Standardabweichungen deutlich kleiner als bei den anderen Bezugsgrößen (vgl. Abb. 4).
Obwohl die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen nicht gerade auffällig sind, läßt sich mit der einfachen Varianzanalyse zeigen, daß sich wohl wenigstens zwei der Mittelwerte unterscheiden. Im weitergehenden Scheffé-Test findet man dann signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen 2 und 4 ($p = 0{,}011$), sowie zwischen den Gruppen 3 und 4 ($p = 0{,}019$).

3.2.6. Zusammenfassung der primären Ergebnisse

Insgesamt gesehen zeigt sich eine Tendenz, wonach Proteinkonzentration, DNA-Gehalt und Prostatagewicht der Gruppen 2 und 3 etwas geringer sind als in den Gruppen 1 und 4 (vgl. Abb. 4). Mit statistischen Methoden läßt sich dies aber nur für das Prostatagewicht verifizieren.

3.3. Gewicht der Tiere

Da sich ein Unterschied bei den Prostatagewichten ergeben hatte, wurde zusätzlich das Gewicht der Tiere statistisch untersucht.

Gruppe 1 1^{15}	Gruppe 2 7^{oo}	Gruppe 3 8^{oo}	Gruppe 4 9^{30}
240	230	215	230
230	230	205	230
230	230	210	240
230	225	210	230
220	220	220	230
230	220	220	230
230	220	220	240
230	220	220	240
240	220	210	230
235	215	210	230

Die Tiere wurden einen Tag vor Versuchsbeginn gewogen; alle Werte sind in g angegeben.

	Gruppe 1 1^{15}	Gruppe 2 7^{oo}	Gruppe 3 8^{oo}	Gruppe 4 9^{30}	
$\bar{x}$	231,5	223	214	233	"
$\tilde{x}$	230	220	212,5	230	g
s	5,8	5,4	5,7	4,8	"
n	10	10	10	10	

Diese Gewichtsverteilung zeigt in der einfachen Varianzanalyse ein hochsignifikantes Ergebnis ($p=3,9x10^{-9}$). Der Kruskal-Wallis-Test ist mit H=27,3 ebenfalls signifikant. Im Scheffé-Test findet man bei den Gruppenvergleichen folgende Resultate:

Gruppen	2/4	p = 0,0028
Gruppen	3/4	p = 0,00000068
Gruppen	1/2	p = 0,0136
Gruppen	1/3	p = 0,00000403
Gruppen	1/4	p = 0,0940
Gruppen	2/3	p = 0,0082

Das Testergebnis zeigt, daß die Tiergruppen, zumindest was das Gewicht angeht, nicht aus derselben Grundgesamtheit stammen, und daß die Verteilung auf die einzelnen Gruppen nicht zufällig gewesen sein kann.

3.4. Abgeleitete Daten

Die folgenden abgeleiteten Ergebnisse wurden aus den Primärdaten rechnerisch ermittelt.
Der Sinn besteht darin, die gemessenen Rezeptorwerte von der Größe der Prostata unabhängig zu machen, indem man auf leicht meßbare und gut vergleichbare Parameter, wie Proteinkonzentration im Cytosol, oder DNA-Gehalt und Prostatagewicht zurückgreift und die gemessenen Daten darauf bezieht. Im allgemeinen korrelieren diese abgeleiteten Größen recht gut miteinander.

3.4.1. Rezeptorbindungsstellen pro mg Protein

Gleichung: $\frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{l Cytosol}} : \frac{\text{g Protein}}{\text{l Cytosol}} = \frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{g Protein}}$

Bei der Berechnung mit Hilfe der, in den Tabellen 3.1. angegebenen Daten muß man berücksichtigen, daß das Cytosol in den Inkubationsansätzen auf das Doppelte verdünnt wurde.
Verwendet man weiterhin die Abkürzungen aus Abschnitt 3.1., so gilt:

$\frac{\text{Rezeptor}}{\text{Protein}} \; \frac{|\text{fmol}|}{|\text{mg}|} = \frac{2 \times H \times 1000}{D}$ vgl. Tabelle 3.4.1.

3.4.2. Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA

Gleichung: $\frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{l Cytosol}} : \frac{\text{mg DNA}}{\text{l Cytosol}} = \frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{mg DNA}}$

Mit den Abkürzungen des Abschnittes 3.1. erhält man:

$\frac{\text{Rezeptor}}{\text{DNA}} \; \frac{|\text{fmol}|}{|\text{mg}|} = \frac{2H \times B/50 \times 1000}{E}$ vgl. Tabelle 3.4.2.

3.4.3. Rezeptorbindungsstellen pro mg Prostata

Gleichung: $\frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{l Cytosol}} : \frac{\text{mg Prostata}}{\text{l Cytosol}} = \frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{mg Prostata}}$

Aus den Daten des Abschnittes 3.1. ergeben sich die Werte nach folgender Formel:

$\frac{\text{Rezeptor}}{\text{Prostata}} \; \frac{|\text{fmol}|}{|\text{mg}|} = \frac{2H \times B/50}{C}$ vgl. Tabelle 3.4.3.

TABELLE 3.4.1. REZEPTORBINDUNGSSTELLEN PRO mg PROTEIN IN fmol pro mg

Tier Nr	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
1	1,12	1,19	5,98	0
2	1,84	6,12	8,03	0,97
3	2,48	7,63	13,72	1,5
4	3,46	15,85	15,78	4,8
5	9,44	21,65	18,37	5,42
6	13,92	35,37	18,0	7,52
7	17,26	33,24	21,08	10,19
8				6,38
9				13,0

TABELLE 3.4.2. REZEPTORBINDUNGSSTELLEN PRO mg DNA IN fmol pro mg

Tier Nr	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
1	25	17	111	0
2	28	64	115	17
3	53	116	230	32
4	66	327	228	74
5	138	361	321	77
6	182	510	286	111
7	301	613	277	221
8				208
9				193

TABELLE 3.4.3. REZEPTORBINDUNGSSTELLEN PRO mg PROSTATA IN fmol pro mg

Tier Nr	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
1	0,044	0,048	0,243	0
2	0,076	0,262	0,311	0,042
3	0,112	0,266	0,510	0,076
4	0,198	0,654	0,546	0,201
5	0,382	0,926	0,738	0,232
6	0,573	1,604	0,739	0,293
7	0,824	1,623	0,937	0,438
8				0,450
9				0,551

3.5. Mittelwert, Median und Standardabweichung für die abgeleiteten Daten

3.5.1. Rezeptorbindungsstellen pro mg Protein

	Gruppe 1 1^{15}	Gruppe 2 $7^{\circ\circ}$	Gruppe 3 $8^{\circ\circ}$	Gruppe 4 9^{30}	
$\bar{x}$	7,08	17,15	14,42	5,54	"
$\tilde{x}$	3,46	15,85	15,78	5,42	fmol/mg
s	6,5	13,22	5,58	4,33	"
n	7	7	7	9	

Um $7^{\circ\circ}$, eine halbe Stunde vor dem Einschalten des Lichtes, sieht man ein deutliches Maximum der Mittelwerte, wobei dieser Wert mehr als doppelt so hoch ist wie das Ergebnis um 1^{15}.
Auch bei $8^{\circ\circ}$ findet man noch deutlich erhöhte Rezeptorwerte, die dann um 9^{30} um mehr als die Hälfte abfallen. Alle Standardabweichungen sind groß, den größten Wert findet man auch hier bei $7^{\circ\circ}$ (vgl. Abb. 5).

Eine Überprüfung dieser Daten mit statistischen Methoden ergab beim Vergleich der Gruppen 2 und 4 im Rangtest nach Mann-Whitney und Sachs ein Ergebnis, das knapp an der Signifikanzgrenze liegt ($p = 0{,}0505$).
Ein varianzanalytischer Vergleich der Mittelwerte zeigt, daß sich mindestens zwei der Mittelwerte auf dem Signifikanzniveau 95 % unterscheiden ($p = 0{,}022$).
Wenn die einfache Varianzanalyse zu einem signifikanten Befund führt, ist man bestrebt, herauszufinden, welche zwei Gruppen sich mit ihren Mittelwerten unterscheiden.
Im Scheffé-Test, der dies prüft, findet sich jedoch beim Vergleich der Gruppen 2 und 4 kein signifikantes Resultat ($p = 0{,}059$).
Auch im H-Test von Kruskal-Wallis, der die Alternativhypothese, wonach die Stichproben nicht derselben Grundgesamtheit entstammen, testet, wird mit $p > 0{,}05$ die Alternativhypothese verworfen.

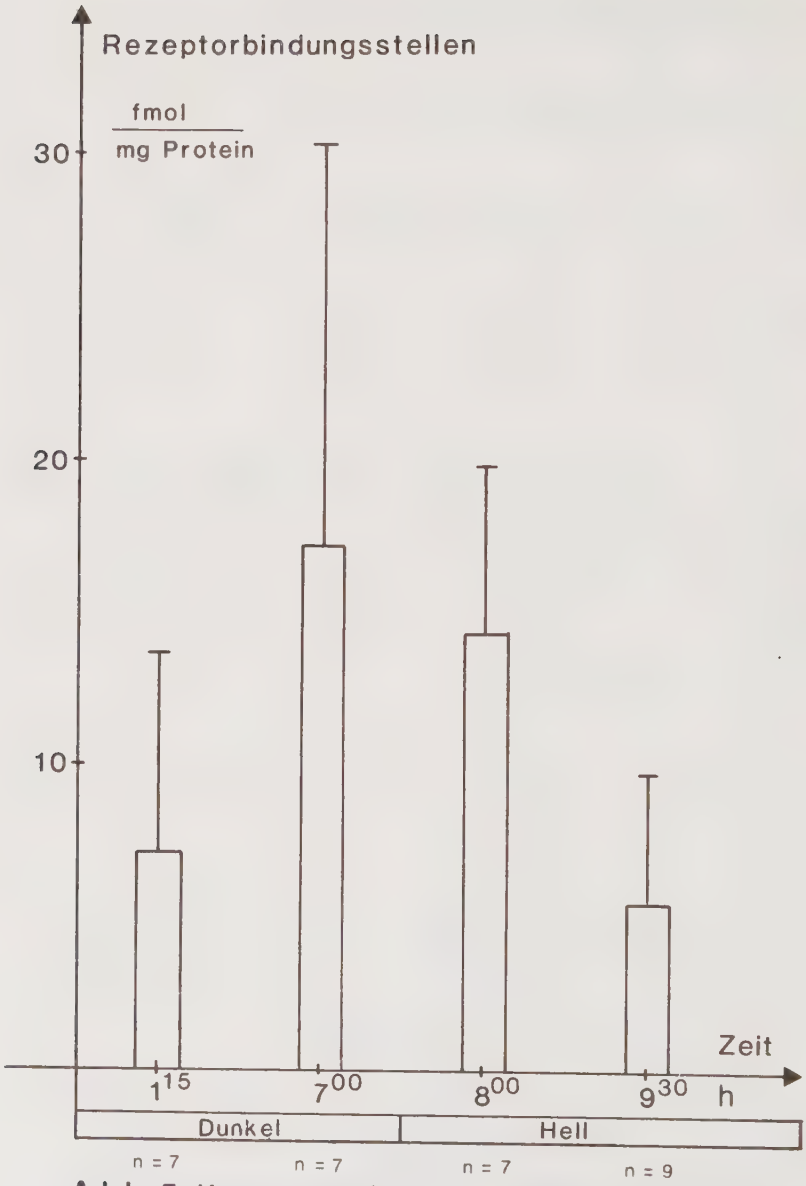

Abb. 5 Konzentration der Rezeptorbindungsstellen pro mg Protein, $\bar{x}+s$.

Also darf die Nullhypothese angenommen werden, die besagt, daß die Stichproben derselben Grundgesamtheit entstammen und sich nur zufällig unterscheiden.

3.5.2. Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA

	Gruppe 1 1^{15}	Gruppe 2 7^{oo}	Gruppe 3 8^{oo}	Gruppe 4 9^{30}	
$\bar{x}$	114	287	224	103	"
$\tilde{x}$	66	327	230	77	fmol/mg
s	102	229	82	85	"
n	7	7	7	9	

Die graphische Darstellung der Mittelwerte der Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA (Abb. 6) gleicht praktisch Abb. 5.
Auch die Standardabweichungen liegen im selben Bereich.

Die einfache Varianzanalyse ergibt mit p = 0,039 auch hier einen signifikanten Befund. Im Scheffé-Test findet man jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen 2 und 4 (p = 0,090).

3.5.3. Rezeptorbindungsstellen pro mg Prostata

	Gruppe 1 1^{15}	Gruppe 2 7^{oo}	Gruppe 3 8^{oo}	Gruppe 4 9^{30}	
$\bar{x}$	0,316	0,769	0,574	0,254	"
$\tilde{x}$	0,198	0,654	0,546	0,232	fmol/mg
s	0,293	0,645	0,248	0,196	"
n	7	7	7	9	

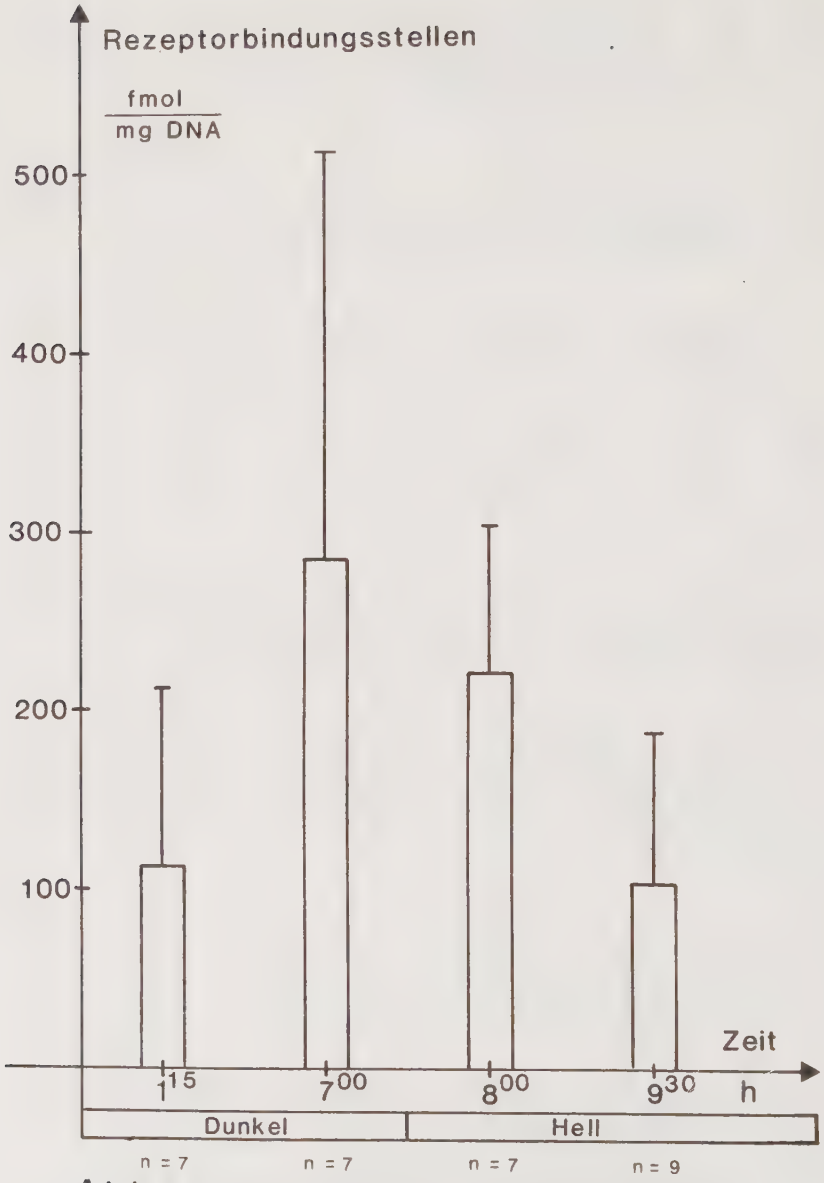

Abb.6 Kozentration der Rezeptorbindungs-stellen pro mg DNA, $\bar{x}+s$.

Diese Werte ergeben im Vergleich zu den anderen abgeleiteten Rezeptordaten keine neuen Erkenntnisse (vgl. Abb. 7).

Bei den statistischen Tests weist die einfache Varianzanalyse wiederum ein signifikantes Resultat auf ($p = 0,046$), während der Scheffé-Test keine signifikanten Unterschiede erkennen läßt ($p = 0,084$).

3.5.4. Zusammenfassung der abgeleiteten Ergebnisse

Alle abgeleiteten Größen korrelieren sehr gut miteinander. Die gemessenen Rezeptorwerte sind am Ende der Dunkelphase am höchsten (7°°) und gut doppelt so hoch wie die Resultate in der Mitte der Dunkelperiode (1^{15}). Eine halbe Stunde nach dem Einschalten des Lichtes (8°°) sind die Rezeptorwerte immer noch deutlich höher als um 1^{15}. Erst um 9^{30} fallen die Werte unter das Niveau des Meßpunktes bei 1^{15} ab. In der einfachen Varianzanalyse ergeben sich für alle drei abgeleiteten Größen signifikante Unterschiede, nicht dagegen im Scheffé-Test.

3.6. Korrelation zwischen den Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA und der Prolaktinkonzentration

Vergleicht man die Werte der Gruppe 2 miteinander, so ergibt sich eine eindeutige Korrelation auf dem Signifikanzniveau = 0,025 einseitig = 0,050 zweiseitig ($R_{korr} = 0,757$ und $p < 0,05$). Innerhalb der anderen Gruppen ist $p > 0,05$.
Beim Vergleich aller Werte der Rezeptorbindungsstellen mit den zugehörigen Prolaktinwerten resultiert: $R_{korr} = 0,333$ und $p > 0,05$. Insgesamt ergibt sich damit keine Korrelation zwischen den Prolaktinkonzentrationen und den abgeleiteten Rezeptorgrößen.

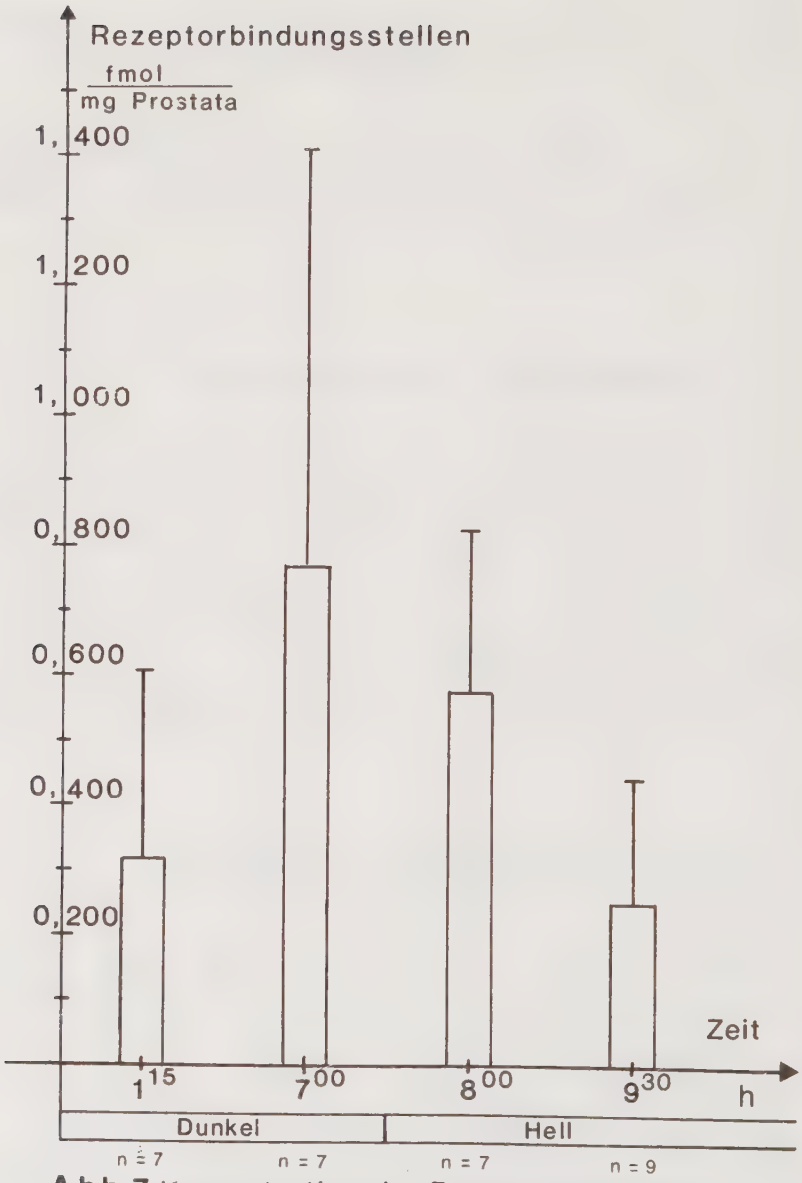

Abb.7 Konzentration der Rezeptorbindungsstellen pro mg Prostata, $\bar{x}+s$.

4. Diskussion

4.1. Fragestellung

In einer Reihe von Arbeiten ist nachgewiesen worden, daß Prolaktin bei der männlichen Ratte einen fördernden und kontrollierenden Einfluß auf Prostata und Samenblasen ausübt (Übersicht bei Jacobi u.a. 1979).
Moeller u.a. (in Vorbereitung) entwickelten die Hypothese, daß Prolaktin seine Wirkung durch Regulation der cytoplasmatischen Androgenrezeptoren entfaltet.
Da man bei der männlichen Ratte typische circadiane Änderungen der Prolaktinkonzentration im Serum feststellen kann (Mattheij und Swarts 1978), wurde untersucht, ob der cytosolische Androgenrezeptor ähnlichen tagesrhythmischen Schwankungen unterworfen ist und ob möglicherweise eine Korrelation zu der Prolaktinkonzentration im Serum besteht.

4.2. Methodik

4.2.1. Lagerung des Prostatagewebes

Das Prostatagewebe wurde bis zur Rezeptorbestimmung als ganzes Organ zwischen 11 und 42 Tagen bei -70°C gelagert. Nach Befunden von Moeller (1982) tritt unter diesen Umständen mindestens 8 Wochen lang kein nennenswerter Rezeptorverlust ein.

4.2.2. Homogenisierung und Zusammensetzung der Puffer

Da Wagner und Jungblut (1976) deutlich machen konnten, daß die Rezeptorausbeute von der Art der Homogenisierung abhängt, wurde zu diesem Zweck der Membrandismembranator verwendet, mit dem sie die besten Ergebnisse erzielten. Dabei werden die Zellen zu 98 % aufgebrochen, jedoch leider auch zelluläre

Organellen weitgehend zerstört, wodurch eine Proteolyse möglich wird und zudem die genaue Lokalisation der radioaktiv ermittelten Rezeptoren nicht eindeutig zu klären ist.

Hormonrezeptoren sind extrem labile und empfindliche Proteine (Mainwaring und Irving 1973). Um ihre Denaturierung während der Homogenisierungsphase möglichst stark einzuschränken, wird zum einen stets bei tiefer Temperatur (0-4°C) gearbeitet, zum anderen durch Pufferzusätze versucht, ihre Stabilität zu verbessern. Es ist wahrscheinlich, daß Rezeptormoleküle in vitro durch eine Vielzahl enzymatischer, temperaturabhängiger Prozesse inaktiviert werden können.

Gaubert u.a. (1980) vermuteten, daß Rezeptormoleküle nur im phosphorylierten Zustand bindungsfähig sind. Dementsprechend würden während der Homogenisierung und Zellzerstörung freigesetzte Phosphatasen die Bindungsfähigkeit beeinträchtigen. Ähnlich empfindlich sind die Hormonrezeptoren auch gegen Proteasen, die beispielsweise mit Diisopropylfluoridphosphat gehemmt werden können (Wilson und French 1979).
Rees und Bell (1975) berichteten, daß sich die Inaktivierungsrate des verwandten und noch anfälligeren Glukokortikoidrezeptors durch Sulfhydrylgruppen schützende Reagenzien deutlich herabsetzen läßt. Als solche verwendeten sie Dithiothreitol und 2-Merkaptoäthanol, das jedoch etwa zwanzigmal weniger wirksam war. Granberg und Ballard (1977) sowie Sando u.a. (1979) konnten die bedeutende Rolle dieser reduzierenden Stoffe bestätigen und weiter erhellen.

Auch bei Androgenrezeptoren sind mehrfach freie Sulfhydrylgruppen nachgewiesen und für die Funktion als notwendig angesehen worden (Mainwaring 1969, Cunningham u.a. 1979, Traish u.a. 1981).
So wurde festgestellt, daß die spezifische Bindung eines radioaktiven Liganden durch eine SH-Blockade mit p-Chlormerkuribenzoat irreversibel verhindert wird (Blaquier 1971). Dagegen kann durch Mersalylsäure eine Ablösung des gebundenen Liganden

vom Androgenrezeptor erreicht werden, die mit Dithiothreitol jedoch rückgängig zu machen ist (Coty 1980, Traish u.a. 1981). Aus diesen Gründen wurde dem Puffer Dithioerythriol (Dithioerythrit), ein Stereoisomer des Dithiothreitols, in hoher Dosis (50 mmol) zugesetzt.
Diese Verbindung enthält zwei Sulfhydrylgruppen, die - ähnlich dem Glutathion - freie SH-Gruppen der Rezeptoren vor einer Oxidation und damit vor dem Funktionsverlust schützen, indem sie das oxidierende Agens "wegfangen" (vgl. Grippo u.a. 1984). Im Vergleich zu den anderen SH-Reagenzien hat Dithiothreitol bzw. das entsprechende Isomer Dithioerythrit den großen Vorteil, daß es bei der Reaktion eine intramolekulare Disulfid-Bindung eingeht und einen sterisch günstigen Sechsring bildet. Deswegen werden empfindliche Proteine bei Anwesenheit von Dithiothreitol als Schutzreagenz durch viel kleinere Konzentrationen von Thiol gegen Oxidation geschützt (Cooper 1981, S. 344).
Vielfach wird auch angegeben, daß sich Rezeptorproteine durch Zusatz von EDTA (Bell und Munck 1973), Glycerin (Høisaeter 1973), einem ATP regenerierendem System (Liao u.a. 1980) oder durch Molybdat stabilisieren lassen. Auf diese Zusätze wurde hier jedoch verzichtet, weil ihre Anwendung entweder ohne nachweisbaren Erfolg blieb, oder nicht ganz komplikationslos war (Moeller 1982).
Gerade für Molybdat sind inzwischen jedoch eindeutige und ausgeprägte Stabilisierungseffekte nachgewiesen worden (Noma u.a. 1980, Rowley u.a. 1984, Carrol u.a. 1984). Ein Zusatz von Molybdat zum vorhandenen Puffersystem scheiterte jedoch an der Bildung von kolloidalem Molybdänsulfid, möglicherweise infolge der ungewöhnlich hohen Dithioerythritkonzentration von 50 mmol.
Zusätzlich wurde dem Puffergemisch 0,25 M Saccharoselösung hinzugefügt, die mit Tris-Puffer auf pH 7,5 eingestellt war. Dies geschah, weil die Androgenrezeptoren unterhalb von pH 6,6 und oberhalb von pH 8,8 ihre Bindungsfähigkeit verlieren (Wilson und French 1976).

Saccharose dient zur Aufrechterhaltung der Isotonie im Suspensionsmedium (Rehfeld und Reichelt 1973).

4.2.3. Prinzip eines Rezeptorassays

Der cytosolische Rezeptor wird mit genügend hohen Mengen eines radioaktiven Liganden gesättigt. Mit einer geeigneten Separierungsmethode trennt man danach das überschüssige, ungebundene Hormon ab und bestimmt den Anteil der unspezifischen Bindung in einem Parallelansatz, in dem das spezifisch gebundene Hormon durch einen Überschuß an unmarkierten Liganden ausgetauscht wird. Durch Differenzbildung errechnet man die Menge des spezifisch gebundenen Hormons und erhält daraus die Konzentration der Rezeptorbindungsstellen (Davies u.a. 1975).

Eine der wesentlichen experimentellen Schwierigkeiten bei der Identifizierung und Charakterisierung eines Hormonrezeptors stellt die sogenannte "unspezifische Bindung" dar (Castañeda und Liao 1975). Da radioaktiv markierte Hormone auch an Bindungsstellen absorbiert werden, die nichts mit hormoneller Signalübermittlung zu tun haben, stellt sich die Frage, wie die eigentlichen Hormonrezeptoren von jenen "unspezifischen Bindungsstellen" unterschieden werden können. Eine Bindung von radioaktivem Hormon wird dann als Ausdruck einer spezifischen Hormon-Rezeptor-Interaktion angesehen, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

a) strenge Stereospezifität
b) hohe Affinität
c) Sättigbarkeit
d) strenge Reversibilität (Jacob u.a. 1978).

4.2.4. Art der Markierung

Eine Markierung der Hormonrezeptoren mit radioaktiven Steroiden läßt sich prinzipiell sowohl in vivo als auch in vitro durchführen. Für quantitative Untersuchungen kommt jedoch nur eine in vitro-Markierung in Frage, da lediglich damit definierbare Inkubationsverhältnisse und eine gute Markierungsrate zu erreichen sind (Moeller 1982).

4.2.5. Wahl des Liganden

Für die Markierung stehen mehrere Liganden zur Auswahl:
der natürliche Ligand Dihydrotestosteron (Bruchovsky und Wilson 1968, Anderson und Liao 1968), zahlreiche synthetische Hormone, von denen Methyltrienolon R 1881 (Velluz u.a. 1963) die größte Bedeutung erlangt hat, sowie das physiologische Hormon Testosteron. Da es mit niedriger Affinität im Prostatacytosol gebunden wird und einen unstabilen Komplex bildet, ist es als Ligand nicht besonders geeignet und daher nur der Vollständigkeit halber erwähnt (Liao u.a. 1973, Snochowski u.a. 1977).

4.2.6. Eigenschaften des DHT

DHT wird spezifisch vom Androgenrezeptor der akzessorischen Geschlechtsdrüsen gebunden und besitzt von allen natürlich vorkommenden Steroiden die höchste Affinität (Delettré u.a. 1980). Unter den Bedingungen, wie sie bei der in vitro-Inkubation vorherrschen, lagert sich DHT zu einem nicht unbedeutenden Teil auch an andere Cytosol- und Serumproteine an (Castañeda und Liao 1975, Davies u.a. 1977, Kirchhoff u.a. 1979).
Heyns u.a. (1976) stellten fest, daß die unspezifische Bindung im Prostatacytosol der Ratte hauptsächlich durch das sogenannte "prostatic binding protein" zustande kommt, das in relativ hoher Konzentration (15 %) dort vorkommt.

Dieses ist wahrscheinlich mit dem -α- Protein von Fang und Liao (1971) identisch. Ein weiterer Teil des Hormons wird von Albumin gebunden (Wagner 1978). Das Bindungsverhalten dieser genannten Proteine ist durch eine niedrige Affinität bei hoher Kapazität charakterisiert und stellt besondere Anforderungen an die Separationstechnik (Heyns und De Moor 1977).

Untersucht man menschliches Prostatagewebe, so wird die Anwendung des DHT dadurch weiter kompliziert, daß dieses Gewebe mit Sexual Hormon Bindendem Globulin (SHBG) verunreinigt ist (Bonne und Raynaud 1976, Mobbs u.a. 1978). Dieses bindet Dihydrotestosteron beinahe mit ähnlich großer Affinität wie der Androgenrezeptor selbst (Westphal 1980). Im Gegensatz zu vielen anderen Arten enthält das Plasma der Ratte jedoch kein derartig spezielles, den Assay störendes Protein (Ritzen u.a. 1971).

Ein zusätzlicher Nachteil des DHT beruht auf der Tatsache, daß es während der Inkubation einem erheblichen Abbau unterliegt (Gore und Baron 1965, Krieg u.a. 1975). Innerhalb von zwei Stunden können selbst bei 0°C etwa 26 % DHT zu 5α-Andro-stan-3α-17ß-diolen umgesetzt werden (Krieg und Voigt 1976), die dann vom Rezeptor nicht mehr gebunden werden (Baulieu und Jung 1970). Moeller (1982) berichtete sogar über so große Verluste, daß auch bei 0°C längere Inkubationszeiten nicht mehr möglich waren. Die Verstoffwechselung des Hormons wird durch eine 3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase bewirkt, die im Prostatacytosol lokalisiert ist und NADPH als Coenzym benützt (Mowszowicz und Bardin 1974, De Moor u.a. 1975).
Die Tätigkeit des Enzyms verringert nicht nur den Anteil an freiem DHT, sondern auch die meßbare spezifische Bindung (Nozu und Tamaoki 1975). Durch Vorinkubation des Cytosols mit NADase läßt sich das Coenzym zerstören und der DHT-Verlust in 24 Stunden bei 0°C auf ca. 10 % beschränken (Moeller 1982).

4.2.7. Eigenschaften des R 1881

Das synthetische Methyltrienolon kann dagegen von den Prostataextrakten nicht metabolisiert werden und wird außerdem nur in geringem Maße unspezifisch gebunden (Bonne und Raynaud 1975). Messungen von Heyns und De Moor (1977) zufolge beträgt die unspezifische Bindung nach 3 Stunden Inkubation von 1 µmol Steroid bei 0°C für R 1881 1,1 %, während DHT zu 9,3 % unspezifisch absorbiert wird. Bei längeren Inkubationszeiten steigt die unspezifische Bindung natürlich noch an.
Die Affinität des R 1881 zum Androgenrezeptor ist früher etwa doppelt so hoch wie die des DHT eingeschätzt worden (Liao u.a. 1973, Pousette u.a. 1979). Inzwischen mehren sich aber Berichte, wonach das Bindungsverhalten der beiden Liganden etwa gleich ist (Davies u.a. 1977, Tezón u.a. 1982, Carrol u.a. 1984), bzw. DHT in Gegenwart von NADase sogar stärker gebunden wird (Moeller u.a. 1983 b).

Die Spezifität des R 1881 muß im Vergleich zum natürlichen Steroid allerdings eher geringer eingestuft werden. Methyltrienolon wird sowohl vom Androgen- als auch vom Progesteronrezeptor spezifisch gebunden (Dubé u.a. 1976, Menon u.a. 1978).
Da Progesteronrezeptoren im Cytosol der Rattenprostata in vernachlässigbar kleinen Mengen vorkommen, ist der künstliche Ligand hierbei zur Bestimmung geeignet (Ishii 1980). Das gilt jedoch nicht ohne weiteres für Gewebe, die in höherem Maße Progesteronrezeptoren enthalten, wie dies etwa beim menschlichen Prostatagewebe der Fall ist (Asselin u.a. 1976). Diesen Nachteil kann man jedoch umgehen, indem man die Progesteronrezeptoren mit Promegeston, einem synthetischen Progestin, oder mit Triamcinolon, einem synthetischen Glukokortikoid, maskiert (Asselin u.a. 1979, Zava u.a. 1979).

4.2.8. Inkubationsbeginn

Die Inkubation mit dem radioaktiven Liganden wurde sofort nach der vollständigen Präparation des Cytosols begonnen. Man kann den Liganden allerdings auch schon früher zusetzen. Es hat sich nämlich gezeigt, daß der Rezeptor-Hormon-Komplex wesentlich stabiler ist als der unbesetzte Rezeptor (Høisaeter 1973, Liao 1975). Durch die Verbindung des Hormons mit dem Rezeptor steigt die Halbwertszeit der Rezeptordegradation bei 0°C von ca 6 Stunden auf mehrere Tage an (Wilson und French 1976). Deshalb sind zahlreiche Autoren dazu übergegangen, das radioaktive Steroid schon vor, bzw. während der Homogenisierung zuzugeben, um die empfindlichen Proteine in dieser besonders anfälligen Phase vor Degradierung zu schützen (Geller u.a. 1975, Krieg u.a. 1977, Mobbs u.a. 1978).

Da jedoch über 80 % der Rezeptoren schon mit endogenem Hormon besetzt sind (Blondeau u.a. 1975), wirkt sich dieser Vorteil nur auf eine kleine Zahl der Rezeptoren aus. Dagegen verliert der Assay viel von seiner Einfachheit, weil mit einer zusätzlichen Kontamination von Material und Gerät zu rechnen ist.

4.2.9. Ligandenkonzentration

Die Markierung der Rezeptoren wurde unter Sättigungsbedingungen durchgeführt, um zu gewährleisten, daß alle vorhandenen Rezeptormoleküle mit einem Liganden besetzt werden können. Das Ausmaß der Sättigung hängt von der Ligandenkonzentration, von der Temperatur und von der Dauer der Inkubation ab (Feherty u.a. 1971).

Die ungefähre Sättigungskonzentration läßt sich vorausbestimmen, wenn man die Dissoziationskonstante K_D des Rezeptorligandenkomplexes kennt. Bedauerlicherweise variieren die in der Literatur angegebenen Werte nicht unerheblich.

Legt man eine K_D von 0,45 nM zugrunde (Wilson und French 1976, Moeller u.a. 1983 b), so kann man mit Hilfe der Gleichgewichtsbeziehung

$$K_D = \frac{|L| \times |R|}{|RL|}$$

die Konzentration berechnen, die nötig ist, um 99 % der Rezeptoren zu besetzen.
Daraus ergibt sich dann für die Ligandenkonzentration |L|:

$$|L| = K_D \times \frac{|RL|}{|R|} = 0{,}45 \text{ nM} \times \frac{99\ \%}{1\ \%} = 44{,}5 \text{ nM}.$$

Die Gesamtkonzentration $|L|_t$ erhält man, wenn auch der gebundene Ligandenanteil bestimmt wird, da gilt: $|L|_t = |L| + |RL|$.
Zur groben Abschätzung der Sättigungskonzentration kann man jedoch |RL| vernachlässigen, da die maximale Anzahl der Bindungsstellen B_{max} (40 fmol/mg Protein) sehr klein ist (Moeller 1982). Eine Konzentration von 45 nM sollte also genügen, um alle Rezeptoren mit Liganden abzusättigen. Tatsächlich kommt man jedoch auch mit geringeren Konzentrationen aus (Moeller 1982). Hier wurde als Endkonzentration 20 nM gewählt. Die beschriebene Rechnung ist stark vereinfacht und berücksichtigt nicht die Möglichkeit der unspezifischen Bindung bzw. einer Rezeptordegradation.

4.2.10. Inkubationstemperatur

Auf Grund der beträchtlichen Hitzelabilität der Rezeptorproteine wurde die Inkubation bei 4°C durchgeführt (Mainwaring 1969). Jede Temperaturerhöhung würde eine Zunahme der unspezifischen Bindung und einen gesteigerten Verlust der spezifischen Bindung durch Rezeptordegradation zur Folge haben (Verhoeven u.a. 1975, Davies u.a. 1976). Carrol u.a. (1984) berichteten, daß mit Hilfe von Molybdat eine derart intensive Stabilisierung des Rezeptors erzielt werden kann, daß die Inkubationstemperatur sich sogar bis zu 30°C steigern läßt.

4.2.11. Inkubationsdauer

Um bei intakten Tieren auch jene Rezeptoren zu markieren, die mit endogenem Steroid besetzt sind, muß die Inkubationszeit, die sonst 1-2 Stunden beträgt, verlängert werden, da die Halbwertszeit für die Dissoziation des Rezeptorligandenkomplexes allein schon zwischen 16 bis 18 Stunden beträgt (Pousette u.a. 1979, Moeller u.a. 1983 b). Zur Markierung von 66 % der Rezeptoren müßte die Inkubationszeit 2-3 Austauschhalbwertszeiten betragen. Mit einer Ausdehnung der Inkubationsdauer steigen allerdings auch Rezeptordegradierung und unspezifische Bindung unvorteilhaft an (Davies u.a. 1976, Moeller 1982). Deshalb wurde die Inkubationszeit auf 24 Stunden beschränkt.
Der Nachteil, daß die Rezeptoren mit der Messung nicht vollständig erfaßt werden, konnte bisher nirgends umgangen werden.

4.2.12. Separation durch die Agargelelektrophorese

Zur Abtrennung des ungebundenen Liganden wurde die Agargelelektrophorese nach Wagner (1972) angewandt. Diese einfache Methode zeichnet sich dadurch aus, daß man bei relativ geringem zeitlichem und apparativem Aufwand eine gute Separierung erzielen kann (Krieg u.a. 1974). Ihr Trennprinzip beruht auf der Tatsache, daß die Rezeptorproteine bei schwach alkalischem pH 8,2 negativ geladen sind. In einem elektrischen Feld wandern sie deswegen zur Anode. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Summe der Ladungen sowie von der Größe und Gestalt der Moleküle und von der Viskosität des Mediums ab (Karlson 1980). Außerdem wird die Beweglichkeit der Proteine auch durch die Stärke des elektrischen Feldes, die Pufferleitfähigkeit und durch die Laufzeit bestimmt (Rehfeld und Reichelt 1973).

Im Falle der Agargelelektrophorese wird die Trennung ferner in starkem Maße durch eine endosmotische Pufferströmung

beeinflußt, deren Ursache in der Struktur des Gels begründet ist. Da Agar aus hochmolekularen Galaktoseschwefelsäureestern besteht (Brandis und Otte 1984), zeigt das Gelgerüst bei alkalischem pH unter dem Einfluß des elektrischen Feldes eine negative Aufladung. Nur die positiven Ionen, nicht aber die fest an der Matrix verankerten Sulfationen, können der elektrischen Kraftwirkung folgen, und es ergibt sich daher eine Strömung der Kationen mitsamt ihres Hydratwassers in kathodischer Richtung (Krauß und Krauß 1979). Dieser, im Agargel sehr stark ausgeprägte, endosmotische "flow" führt dazu, daß - trotz der anionischen Aufladung aller Proteine bei pH 8,2- ein Teil der ß-Globuline (z.B. SHBG) und die γ-Globuline zur Kathode wandern (Wagner 1972, Rehfeld und Reichelt 1973). Auf Grund seiner starken negativen Ladung (Mainwaring und Irving 1973) bewegt sich der Androgenrezeptor zur Anode und findet sich in den Fraktionen 8-13 (vgl. Abb. 1) (Wagner und Jungblut 1976).

Albumin und das von Heyns u.a. (1976) beschriebene "prostatic binding protein" eilen dem Rezeptor dagegen voraus (Wagner 1978). Eine vollständige Abtrennung der unspezifischen Bindung gelingt jedoch nicht (Davies u.a. 1975, Moeller 1982).
Mit dem Pufferstrom wird das überschüssige, freie und ungeladene Hormon zur Kathode gespült und der Trennprozess somit in außerordentlich günstiger Weise unterstützt (Wagner 1972). Die Abtrennung des ungebundenen Liganden ist nach 90-120 Minuten vollständig (Wagner 1978).

Da die Agargelelektrophorese ungebundenes Steroid von gebundenem relativ rasch abtrennt, wird das dynamische Gleichgewicht, das während der Inkubation noch vorherrscht, gestört. Demzufolge setzen sofort Dissoziationsvorgänge ein. Das unspezifisch gebundene Hormon dissoziiert während der Elektrophorese zu einem großen Teil ab (Davies u.a. 1975) und strömt mit dem Lösungsmittelfluß in Längsrichtung zur Kathode (Wagner 1978).

Unterschiedliche Auffassungen bestehen jedoch seitens des unerwünschten Dissoziationsverhaltens der Rezeptorhormonkomplexe. Während Wagner (1978) für den DHT-Rezeptorkomplex eine ungewöhnlich hohe Dissoziationsrate von 25 % pro Stunde angab, berichtete Krieg (1976) über Verluste infolge Dissoziation, die unter 5 % lagen. Dies stünde im Einklang mit der von mehreren Autoren niedrig bestimmten Dissoziationsrate des besetzten Androgenrezeptors (Ritzen u.a. 1974, Attramadal 1975). Um die temperaturabhängige Dissoziation und die Inaktivierung des Rezeptors gering zu halten, wird das Agargel während der gesamten Elektrophorese kontinuierlich auf -2°C gekühlt. Der schwach alkalische pH-Wert von 8,2, der zur elektrischen Trennung notwendig ist, führt zu keiner beschleunigten Degradierung (Wagner 1978).

Vorteilhaft an dieser Trennmethode sind die niedrige Nachweisgrenze (3 fmol/mg Protein) und die Tatsache, daß auch sehr kleine Probenmengen analysiert werden können (Wagner 1972). Selbstverständlich existiert eine ganze Reihe von anderen Trennverfahren, die ebenfalls schon mit Erfolg zur Separierung von Steroidrezeptoren angewandt wurden (Hu u.a. 1978).
Die wichtigsten Verfahren sind die Zentrifugation im Dichtegradienten, die Gelfiltration, Adsorption an Aktivkohle, sowie Fällungsmethoden mit Ammoniumsulfat oder Protaminsulfat. Größtenteils zeichnen sie sich jedoch dadurch aus, daß sie zu aufwendig sind, zu ungenügender Trennung führen oder mit großem Rezeptorverlust verbunden sind (Moeller 1982).

4.2.13. Supprimierung der spezifischen Bindung

Ihrem Bindungscharakter nach kann man die spezifische Bindung deutlich von der unspezifischen Adsorption unterscheiden (Smith u.a. 1983 a). Während sich die Rezeptoren durch hohe Affinität (K_D = 0,1 -1 nM ≙ high affinity) und durch eine sehr geringe Konzentration in den Zielgeweben (0,1-1 mg/kg Gewebe ≙ low capacity) auszeichnen, sind die unspezifisch bindenden Cytosol-

proteine in großer Menge vorhanden (10 mg/ml Cytosol ≙ high capacity) und können pro Molekül zahlreiche Liganden, wenn auch mit niedriger Affinität (K_D = 0,1-1 mM ≙ low affinity) binden (Wagner 1978).

Fügt man in einem Parallelversuch dem Cytosol außer dem radioaktiven Liganden noch ein hundertfaches Überangebot an nicht markiertem Hormon zu, so verringert sich die Zahl der spezifisch gebundenen radioaktiven Liganden auf weniger als 1 %, weil die anderen markierten Liganden mit radioinertem Steroid um die Bindung konkurrieren und nicht gebunden werden können. Von 101 besetzten Bindungsstellen kann, statistisch betrachtet, nur 1 mit radioaktivem Liganden reagiert haben, während die restlichen mit radioinertem Hormon besetzt sind. Dies bedeutet, daß die Markierung mit radioaktivem Liganden bei diesem Verfahren zu mehr als 99 % unterdrückt wird. Man geht bei diesem Verfahren davon aus, daß die unspezifische Adsorption an Cytosolproteine in etwa gleich bleibt. Kuch (in Vorbereitung) und Oettling (in Vorbereitung) zeigen, daß diese Annahme nicht ganz richtig ist.

Die Effektivität solcher Verdrängungsversuche ist jedoch schon häufig unter Beweis gestellt worden (Baulieu und Jung 1970, Mainwaring und Milroy 1973). Damit in beiden Ansätzen der Reststoffwechsel des Dihydrotestosterons gleichgroß gehalten werden kann, ist R 1881 als unmarkierter Ligand ausgewählt worden. Würde statt dessen ebenfalls DHT benützt werden, so müßte man als Nachteil in Kauf nehmen, daß im supprimierten Ansatz, wegen der hohen Steroidmenge, vergleichsweise weniger radioaktives DHT metabolisiert werden könnte. Damit wären die Ansätze jedoch nicht mehr vergleichbar (Moeller 1982).

4.2.14. Rechnerische Ermittlung der verfügbaren Rezeptorbindungsstellen

Da die spezifischen Rezeptormoleküle nicht direkt meßbar sind, bestimmt man die Komplexe, die sie mit radioaktivem Hormon bilden. Man geht davon aus, daß die Hormonrezeptoren nur eine einzige Bindungsstelle pro Molekül besitzen (Wagner 1978, Karlson 1983). Deshalb ist unter Sättigungsbedingungen die Konzentration des spezifisch gebundenen Steroids gleich der Konzentration der Rezeptorproteine. Damit werden nur die Rezeptoren berücksichtigt, die tatsächlich radioaktives Hormon gebunden haben. Üblicherweise wird die spezifische Bindung definiert als die Bindung des ^{3}H-DHT in Abwesenheit eines unmarkierten Liganden minus der Bindung des radioaktiven DHT, gemessen in Gegenwart eines hundertfachen Überangebotes von nicht radioaktivem R 1881 (Krieg und Voigt 1976, Pousette u.a. 1979).
Konkret bedeutet dies, daß die spezifische Bindung durch Subtraktion der in der Agargelelektrophorese ermittelten anodischen Peaks A_1 bzw. A_2 bestimmt wird: $\Delta = A_1 - A_2$.

4.2.15. Zufällige Fehler bei der Rezeptorbestimmung

Es leuchtet ein, daß ein solches Subtraktionsverfahren nur dann von Wert ist, wenn in beiden Ansätzen auch tatsächlich dieselben Bedingungen vorherrschten, identische Mengen an Cytosol und radioaktivem Hormon vorgegeben waren und während des Elektrophoreselaufes gleichgroße Trennkräfte einwirken konnten. Exakt übereinstimmende Mengen des radioaktiven Liganden sind jedoch praktisch nicht zu erreichen. Dies liegt daran, daß sich geringe Pipettierfehler nicht vermeiden lassen und sich hier besonders ungünstig auswirken können. Der Pipettierfehler lag bei Parallelansätzen zwischen 0,1 und 7,8%.
Im ungünstigsten Fall bedeutet dies, daß beispielsweise Ansatz 1 nur 9,2 µl, Ansatz 2 dagegen 10,8 µl radioaktives Hormon enthält.

Bei einer vorgegebenen Konzentration von 20 nM entsprechen 10 µmol des radioaktiven Hormons z.B. 273107 cpm. In der Inkubationslösung des Ansatzes 1 findet man dann 62814 cpm/50 µl, während man im Ansatz 2 73739 cpm/50 µl mißt. Es ist klar, daß dadurch im Ansatz 2 der unspezifische Bindungsanteil stärker ansteigt und bei der anschließenden Differenzbildung eine deutliche Unterschätzung der spezifischen Bindung die Folge sein muß.
Um von vornherein derartig unvorteilhafte Auswirkungen der Pipettierfehler einzuschränken, wurden nur solche Versuche bei der Wertung zugelassen, bei denen sich in beiden Ansätzen die im Agargel wiedergefundenen Radioaktivitätsmengen $A_1 + B_1 + X_1$ bzw. $A_2 + B_2 + X_2$ lediglich um $\pm$ 6 % unterschieden (vgl. 3.1.).

Ungünstig wäre ferner, wenn der Androgenrezeptorkomplex während der Agargelelektrophorese nicht in beiden Ansätzen gleich weit wandern würde. Dies könnte möglich sein, wenn durch irgendwelche Verunreinigungen, Luftblasen oder mechanische Defekte des Agar Inhomogenitäten des elektrischen Feldes oder des davon abhängigen endosmotischen Pufferstromes zustande kämen. Zur Vermeidung dieser Störungen wurde die Elektrophorese beider Ansätze auf einer einzigen Gelplatte durchgeführt und besondere Sorgfalt bei der Gelpräparation angewandt.

4.2.16. Systematische Fehler bei der Rezeptorbestimmung

Da durch die Supprimierung im Ansatz 2 mehr markierter Ligand für die unspezifische Bindung zur Verfügung steht, wird bei der erwähnten Berechnungsart die spezifische Bindung unterschätzt. Oettling (in Vorbereitung) hat eine Korrekturformel hergeleitet und ausführlich diskutiert, die diesen systematischen Fehler vermeidet und außerdem zufällige, durch Pipettierstreuungen verursachte Fehler zum Teil neutralisiert. Durch die Anwendung der Korrekturformel $\Delta_{korr} = A_1 - A_2 \times \frac{B_1}{B_2}$ läßt sich die Reliabilität

bzw. Präzision des Assays deutlich verbessern und die Intra-assayvariation verringert sich dadurch auf ca 10 % (Moeller 1982). Außerdem kann hiermit die Validität des errechneten Wertes für die spezifische Bindung angehoben werden (Oettling, in Vorbereitung).

4.2.17. Strategie des Assays

Infolge der hohen Spezifität und Affinität wurde radioaktives DHT bei der Rezeptormarkierung bevorzugt. Der ungünstige DHT-Stoffwechsel wurde durch Vorinkubation mit NADase-haltigem Puffer weitgehend gehemmt. Im Parallelansatz wurde anstelle des DHT jedoch ein Überschuß des radioinerten R 1881 zur Suppression der spezifischen Bindung verwendet (vgl. 4.2.13.). Dadurch läßt sich der Reststoffwechsel des DHT in beiden Ansätzen gleichhalten, und es können so negative Resultate bei der Differenzbildung vermieden werden. Mit der Agargelelektrophorese wird der markierte Rezeptor schließlich von freiem Hormon abgetrennt.

4.2.18. DNA-Bestimmung

Angewandt wurde die Methode von Burton (1956). Diese ist spezifischer und weniger gegen Störungen anfällig als die Bestimmung von Dische (1930).
Die Präparation erfolgte nach einer Methode von Wagner und Gaues (1972). Fehler ergeben sich infolge eines Substanzverlustes bei den verschiedenen Teilschritten sowie durch Pipettierfehler. Der Gesamtfehler wird auf maximal 3 % geschätzt. Die gemessenen Extinktionen schwankten zwischen 0,105 und 0,650 und waren im linearen Bereich der Eichkurve enthalten. Der Korrelationskoeffizient für die Eichgerade betrug 0,999, 0,998 bzw. 0,997.

4.2.19. Proteinbestimmung

Die Bestimmungsmethode beruht auf der Bindung des sauren Azofarbstoffes an basische Gruppen der Proteine (Krauß und Krauß 1979). Das Verfahren hat den Vorteil, daß Dithioerythrit und Tris-Puffer den Assay nicht stören; außerdem ist es zuverlässiger als die von Lowry u.a. (1951) angegebene Variante (Schaffner und Weismann 1973).
Die Präzision ist abhängig von Volumenfehlern, die beim Pipettieren (5 µl $\pm$ 0,2 µl) zustande kommen, und von Fehlern, die beim Ablesen des Photometers auftreten können (Parallaxe). Beim Aufstellen der Eichgeraden ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,998 bzw. 0,997. Insgesamt ist der Fehler mit $\pm$ 5 % zu veranschlagen. Die gemessenen Extinktionswerte (0,35-0,74) lagen alle innerhalb des linearen Bereiches der Eichkurve.

4.2.20. Wahl der Untersuchungszeitpunkte

Die Auswahl der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte orientierte sich zunächst an der in der Literatur dargestellten Serumprolaktinkonzentration. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, daß Prolaktin möglicherweise nicht sofort, sondern mit Verzögerung auf die Konzentration des Androgenrezeptors wirkt.

4.2.20.1. Prolaktinkonzentration im Serum der männlichen Ratte

Die Sekretionsweise des Prolaktins der Ratte war lange umstritten. Zuerst berichteten Dunn u.a. (1972) über einen möglichen circadianen Rhythmus mit hohen Nacht- und niedrigen Tagwerten. Kizer u.a. (1975) konnten mit ihren Untersuchungen einen derartigen Rhythmus bestätigen. Hingegen fanden Rønnekleiv u.a. (1973) besonders hohe Prolaktinwerte am frühen Morgen. Andere Arbeitsgruppen hatten dagegen keine tagesabhängigen Konzentrationsänderungen des Prolaktins im Serum feststellen können (Amenomori u.a. 1970, Taya und Igarashi 1974, Seggie

und Brown 1976). Außerdem stellte sich heraus, daß die Prolaktinwerte extrem durch Streßeinflüsse verändert werden können (Krulich u.a. 1974).
So bestanden die Unstimmigkeiten, ob und zu welchen Tageszeiten die Konzentration des Serumprolaktins sich ändert, zunächst fort. Erst als mit der Einführung von intraatriellen Verweilsonden ein problemloseres Sammeln von Blutproben und vor allem ein kontinuierliches Messen möglich geworden war, konnte in der zweiten Hälfte der 70-er Jahre Klarheit erzielt werden.

Durch diese verbesserte Technik gelang es, nachzuweisen, daß Prolaktin nicht kontinuierlich, sondern über eine pulsative Sekretion ins Blut abgegeben wird. Die Ausschüttung erfolgt in diskreten episodischen Schüben ohne ein regelrechtes Muster (Willoughby u.a. 1977). Nachts sind Frequenz und Amplitude der Prolaktinpeaks höher und auch variabler als während des Tages (Mattheij und Swarts 1978, Willoughby 1980). Der Beginn vermehrter Pulsationen liegt bereits am späten Nachmittag gegen 16°°-17°°, wenn die Tiere insgesamt aktiver werden (Rønnekleiv u.a. 1978). Regelmäßig treten auch an der Dunkel-Hell-Interphase, also morgens, erhöhte Prolaktinwerte auf (Hostetter und Piacsek 1977 a, Willoughby 1980). Der von den erwähnten Arbeitsgruppen ermittelte, insgesamt als circadian zu bezeichnende Rhythmus ist schematisch in Abb. 8 dargestellt.

4.2.20.2. Latenzzeit einer möglichen Prolaktinwirkung

Die Zeit, nach der die Auswirkung eines Hormons eintritt, hängt von seinem Wirkungsmechanismus ab. Bisher sind 2 grundsätzliche Wirkungsarten bekannt:

1.) Hormonwirkung durch Genaktivierung
Viele Hormone, besonders die Steroide, bewirken die Induktion bestimmter Enzyme oder anderer Proteine im Erfolgsorgan. Im allgemeinen nimmt dieser Prozess Stunden bis Tage in Anspruch, wesentliche Änderungen zeigen sich nach 4-24 Stunden (Yamamoto und Alberts 1976).

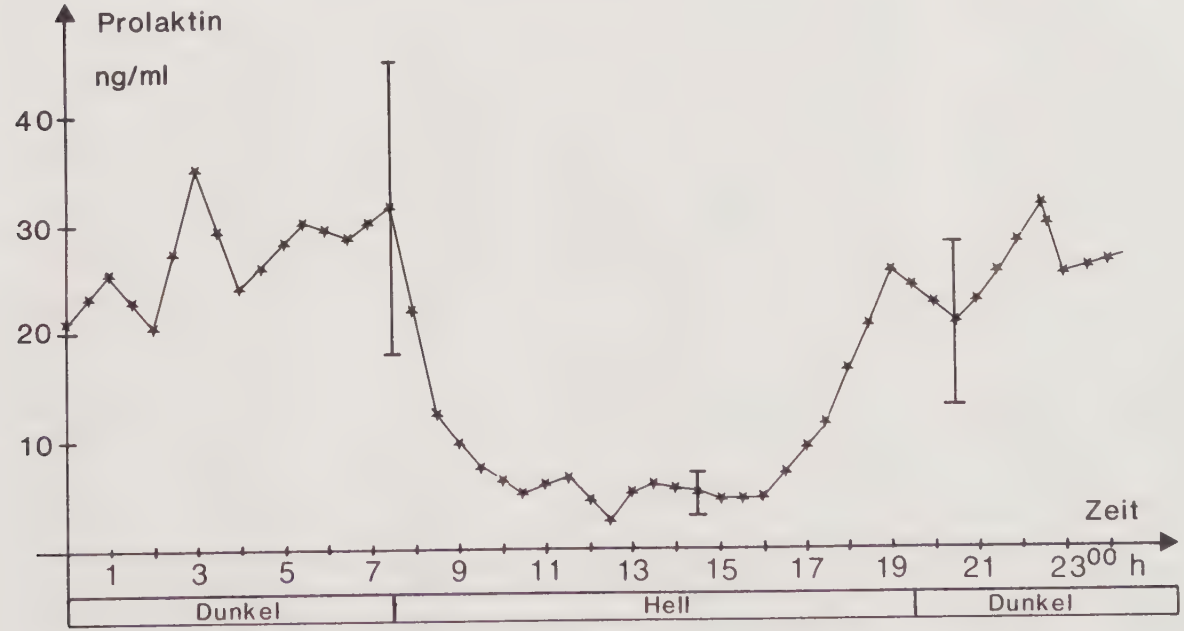

Abb.8 Schematische Darstellung der Variabilität des Serumprolaktinspiegels der Ratte über 24 h in Anlehnung an Mattheij und Swarts (1978) sowie Willoughby (1980).

2.) Hormonwirkung durch einen "second messenger"
Peptidhormone wirken über Membranrezeptoren. Die Wechselwirkung des Hormons mit seinem Rezeptor führt zu einer Aktivierung der Adenylat-Zyklase und der Produktion von c-AMP, welches die Rolle des "second messengers" übernimmt. Je nach Zielorgan kann diese Wirkung sehr unterschiedlich sein. Im Gegensatz zu den Steroidhormonen erfolgt die physiologische Antwort auf Peptidhormone in Zeiträumen von Sekunden oder Minuten, also recht schnell (Malkinson 1975).

Die Induktionswirkung auf den Zellkern und die Aktivierung der Adenylat-Zyklase brauchen sich nicht gegenseitig auszuschließen; manche Hormone scheinen über beide Mechanismen zu wirken (Karlson 1980).

Der Wirkungsmechanismus von Prolaktin an der Prostata ist noch nicht sicher bekannt. Golder u.a. (1972) entdeckten, daß Prolaktin die Aktivität der Adenylat-Zyklase erhöht, wenn es zusammen mit Prostatahomogenaten inkubiert wird. In Membranfraktionen aus Zellen der ventralen Rattenprostata konnten spezifische Bindungsstellen für Prolaktin nachgewiesen werden (Aragona und Friesen 1975, Kledzik u.a. 1976, Barkey u.a. 1977).
Zur Zeit wird bezweifelt, daß die Wirkung des Prolaktins durch c-AMP vermittelt wird (Smith u.a. 1983 b, Alberts u.a. 1983, Zubay 1983).

In der Brustdrüse bewirkt Prolaktin nach der Interaktion mit dem Membranrezeptor innerhalb weniger Stunden eine gesteigerte Synthese von m-RNA für spezifische Milchproteine wie etwa Casein. Die verstärkte Synthese von Casein und α-Lactalbumin ist nach einer Verzögerung von 8-10 Stunden festzustellen. Der Mechanismus, über den Prolaktin die spezifische m-RNA Synthese stimuliert, ist nicht bekannt (Smith u.a. 1983 b).

Prinzipiell ist auch eine Modifizierung des "second messenger"-Modells denkbar. Rillema (1975) berichtete beispielsweise über eine mögliche Rolle des Prostaglandins F 2α bei der Steigerung der RNA-Synthese von Mammazellkulturen durch Prolaktin als "second messenger".

Da die höchsten Prolaktinwerte nachts und morgens an der Hell-Dunkel-Interphase auftreten, wurden die ersten drei Zeitpunkte in diesen Bereichen gewählt. Die Hell-Dunkel-Grenze ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, weil sich hier die Prolaktinsekretion in sehr kurzer Zeit drastisch von hohen zu niedrigen Werten ändert.
Ein schnell wirkender Mechanismus, wie etwa die Aktivierung der Adenylat-Zyklase, sollte hier deutliche Änderungen der Androgenrezeptormenge bewirken. Als erster Zeitpunkt wurde 1^{15} gewählt. Zu dieser Zeit sind die Prolaktinwerte bereits seit einigen Stunden erhöht. Gegen 7°° ist der Prolaktinspiegel ebenfalls wieder hoch, um dann, nach Einschalten des Lichtes bei 7^{30}, rasch abzufallen. Um 8°° ist die Prolaktinkonzentration entsprechend niedrig. Damit jedoch auch Effekte, die durch de novo-Synthese ausgelöst werden, berücksichtigt werden können, wurde als vierter Zeitpunkt 9^{30} gewählt. Die Zeitdauer seit Ansteigen der Prolaktinausschüttung wäre hier genügend groß, um durch Genaktivierung entstandene Konzentrationsänderungen des Androgenrezeptors erfassen zu können. Für einen rasch einsetzenden Effekt könnte dieser Zeitpunkt als Nullwert dienen, da die Prolaktinkonzentration zu dieser Zeit bereits für ca 2 Stunden auf Niedrigwerte abgefallen ist.

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Prolaktinkonzentration im Serum

Die gemessenen Prolaktinwerte lassen sich gut in den bekannten circadianen Rhythmus einordnen (vgl. Abb. 3) und entsprechen damit den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen. Allerdings sind die gemessenen Werte höher als die von Mattheij und Swarts (1978) bzw. von Willoughby (1980) gefundenen Werte (vgl. Abb. 8). Dies liegt jedoch an der unterschiedlichen Art der Blutgewinnung. Es hat sich nämlich gezeigt, daß Prolaktin bei der Ratte zahlreiche, charakteristische Eigenschaften eines "Streßhormons", wie etwa ACTH, besitzt (Krulich u.a. 1974).

Allein das Herausnehmen eines Tieres aus seinem Käfig führt innerhalb von zwei Minuten zu einer Steigerung der Prolaktinkonzentration im Serum auf das 2-3-fache des Ausgangswertes (Mattheij und van Pijkeren 1977). Stärkere Stimuli kurzer Dauer, wie etwa Äthergeruch, Einschränkung der Bewegungsfreiheit oder i.m.-Injektionen, steigern die Prolaktinausschüttung sogar auf das 4-6-fache des Ruhewertes (Krulich u.a. 1974).
Das Töten und Dekapitieren einer einzigen Ratte bewirkt bei den anderen Tieren im Raum ebenfalls nach ca zwei Minuten eine deutliche Erhöhung des Serumprolaktins (Harms u.a. 1975). Weitere Störeffekte sind die Anwesenheit des Experimentators im Raum, Geräusche und der Geruch von Blut (Krulich u.a. 1974). Nach ca 30 Minuten normalisieren sich die Werte im allgemeinen wieder (Krulich u.a. 1974). Bei stärkeren Streßstimuli kann die Normalisierung nach 90 Minuten noch ungenügend sein (Euker u.a. 1975). Lediglich durch sehr rasches Dekapitieren, innerhalb einer Minute nach Streßbeginn, kann man der streßbedingten Prolaktinerhöhung vorbeugen (Mattheij und van Pijkeren 1977). Im vorliegenden Fall würde dies bedeuten, daß man 10 Tiere innerhalb von zwei Minuten töten und ausbluten müßte. Technisch läßt sich dies nur durchführen, wenn mehrere Personen helfen würden.

Infolge der dadurch bedingten Unruhe würde bei den Tieren die Prolaktinkonzentration im Serum, wiederum streßbedingt, ebenfalls ansteigen. Bei der von Mattheij und Swarts (1978) bzw. von Willoughby (1980) verwendeten Kathetertechnik können dagegen streßfreie Werte ermittelt werden (Mattheij und van Pijkeren 1977). So erklärt sich also die unterschiedliche Größe der gemessenen Werte. Hostetter und Piacsek (1977 a), die Plasma durch Dekapitieren der Tiere gewannen, gaben ebenfalls Prolaktinwerte im Bereich von 25-100 ng/ml an. Nun stellt sich noch die Frage, warum die einzelnen Messungen so starke Streuungen aufweisen. Auch dieses Phänomen ist in der Literatur mehrmals beschrieben worden.
Seggie und Brown (1976) stellten fest, daß die Prolaktinkonzentration auch von der Reihenfolge des Tötens abhängig ist. Bei den Tieren, die gegen Ende einer Sitzung getötet werden, kann das Serumprolaktin bis auf das 10-fache erhöht sein. Mattheij und Swarts (1978) betonten die individuellen Sekretionsmuster und die hohen Fluktuationen der Werte bei einzelnen Tieren. Bei 100 "ungestreßten Tieren" können die Serumprolaktinspiegel zwischen 3-65 ng/ml schwanken (Krulich u.a. 1974).

4.3.2. Rezeptorbindungsstellen bezogen auf Proteinkonzentration, DNA-Gehalt und Prostatagewicht

Die erhaltenen Werte sind insgesamt etwas niedriger, ihre Streuungen höher als bei den Messungen von Moeller u.a. (1983 a). Carrol u.a. (1984) berichteten über einen Rezeptorgehalt von 20,2 fmol/mg Protein, allerdings in Gegenwart von Molybdat. Die gemessenen, signifikanten Unterschiede bei den Werten zwischen 7^{00} und 9^{30} lassen eine tagesabhängige bzw. vom Hell-Dunkel-Rhythmus abhängige Änderung der Rezeptorkonzentration vermuten. Jedoch kann nicht beurteilt werden, ob die signifikanten Änderungen Ausdruck eines reproduzierbaren circadianen Rhythmus oder lediglich charakteristisch für den einzigen Versuchstag gewesen sind.

Ferner ist zu fragen, inwieweit die nicht ganz zufällige Gruppeneinteilung der Tiere das Ergebnis beeinflußt hat. Denn die Tiergruppen 1 und 4, bei denen niedrigere Rezeptorkonzentrationen gemessen wurden, unterschieden sich von den anderen Gruppen im Prostata- und Tiergewicht. Das unterschiedliche Gewicht der Tiere kann am ungleichen Alter oder Ernährungszustand liegen (vgl. 2.5. und 3.3.). Beides kann nicht überprüft werden, da die Tiere von einer Zuchtanstalt bezogen worden sind. Moeller (1982) hat Untersuchungen über den Einfluß des Alters der Tiere auf die meßbare spezifische Bindung des Androgenrezeptors durchgeführt. Dabei fand er im Bereich zwischen 65-70 Tagen Unterschiede, die maximal in der Größenordnung von 8 fmol/mg Protein lagen, wobei den jüngeren Tieren in dieser Altersstufe auch niedrigere Werte zugeordnet waren. Allerdings war der Unterschied nicht signifikant. Bei den vorliegenden Messungen besitzen aber gerade die leichteren Tiere höhere Rezeptorwerte, so daß man daraus schließen könnte, daß hier die gemessenen Konzentrationsunterschiede durch einen anderen Effekt bewirkt wurden, da der Altersunterschied den gegenteiligen Einfluß ausüben sollte.

Welche Auswirkungen das Körpergewicht auf den Rezeptorgehalt hat, läßt sich nicht ohne weiteres vorhersagen. Im vorliegenden Fall besitzen die Tiere niedrigeren Körpergewichts auch ein kleineres Prostatagewicht sowie einen geringeren Protein- und DNA-Gehalt der Prostata. Bei dieser Konstellation sollte man annehmen, daß auch der Rezeptorgehalt niedriger ist. Genauere Studien sind jedoch nicht bekannt.
Da die Gewichtsabweichungen insgesamt gering sind, sollten sich deswegen in jedem Fall keine gravierenden Veränderungen der Rezeptorwerte ergeben.

Circadiane Rhythmen sind insbesondere für den Östrogenrezeptor beschrieben worden, und zwar sowohl bei der Ratte (Hughes u.a. 1976) als auch bei Brustdrüsenzellen von Mäusen (Labrosse u.a. 1978).

Spelsberg und Halberg (1980) berichteten über signifikante jahreszeitliche Schwankungen der Konzentration des Progesteronrezeptors im Eileiter von Kücken. Diese Rhythmen zeigen, daß Steroidrezeptoren keine konstanten Größen sind, sondern sich sowohl in ihrer Zahl als auch in ihrer Funktion verändern können. Obwohl diese Schwankungen noch nicht völlig verstanden sind, spielen sie wahrscheinlich eine Rolle bei der Steuerung der Fortpflanzung (Spelsberg und Halberg 1980).

4.3.3. Korrelation zwischen den Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA und der Serumprolaktinkonzentration

Berücksichtigt man alle Werte, so ergibt sich eindeutig keine Korrelation zwischen den gemessenen endogenen Prolaktinwerten und den ermittelten Rezeptorkonzentrationen pro mg DNA. Lediglich isoliert für die 7°°-Werte findet sich eine signifikante Korrelation zwischen beiden Größen.
Dies läßt den Schluß zu, daß Prolaktin zumindest kurzfristig keinen Einfluß auf die Androgenrezeptorkonzentration hat.
Da die Korrelation der 7°°-Werte deutlich ist, besteht jedoch die Möglichkeit, daß länger zurückliegende Erhöhungen des Serumprolaktins in der Lage sind, die Zahl der cytosolischen Androgenrezeptoren anzuheben. Dies stünde im Einklang mit der Feststellung von Smith u.a. (1983 b), wonach Prolaktin erst nach etwa 8-10 Stunden die Synthese von Casein und Lactalbumin in der Brustdrüse nachweisbar steigert. Möglicherweise ist diese Korrelation aber auch nur zufällig entstanden.

4.4. Literatur zum Thema

4.4.1. Die Prolaktinwirkung auf die akzessorischen Sexualdrüsen

Die Bedeutung des Prolaktins für die Funktion der Prostata ist bereits von zahlreichen Autoren hervorgehoben worden. Grayhack u.a. (1955) beobachteten, daß die gleichzeitige Gabe von Testosteron und Prolaktin bei kastrierten und hypophysektomierten Ratten eine stärkere Gewichtszunahme der Prostata bewirkt als die alleinige Verabreichung von Testosteron.
Keenan und Thomas (1975) konnten diesen Synergismus bestätigen. Umgekehrt läßt sich durch Injektionen eines Antiserums gegen Prolaktin bei Kaninchen eine Verkleinerung der Prostata erreichen (Asano u.a. 1971). Bartke (1974) konstatierte eine Größenabnahme der Samenblasen von Mäusen, bei denen mit der dopaminergen Substanz Ergocornin die Prolaktinfreisetzung im Hypothalamus gehemmt worden war.

Die alleinige Gabe von Prolaktin in Abwesenheit von Androgenen hat jedoch keinen Einfluß auf das Wachstum und die Größe der akzessorischen Drüsen (Grayhack u.a. 1955, Segaloff u.a. 1956, Keenan und Thomas 1975) bzw. auf die Vermehrung der Prolaktinbindungsstellen im Sinne einer Autoregulation (Kledzig u.a. 1976). Spezifische Bindungsstellen für Prolaktin sind von mehreren Arbeitsgruppen in Membranfraktionen von Prostatahomogenaten nachgewiesen worden (Aragona und Friesen 1975, Kledzig u.a. 1976, Barkey u.a. 1977). Es gibt jedoch auch Ergebnisse, die den fördernden Einfluß auf Prostata und Samenblasen in Frage stellen. So registrierte Johnson (1974) bei hypophysektomierten Ratten keine Erhöhung der Testosteronwirkung durch Prolaktin, gemessen am Gewicht der Prostata. Mit gleichzeitigen Injektionen von Testosteron und Prolaktin konnten Kledzig u.a. (1976) bei kastrierten Ratten die Konzentration der Prolaktinbindungsstellen nicht deutlicher steigern als dies durch geringe Testosterondosen bereits möglich war. Diese unterschiedlichen Befunde können möglicherweise auf Unterschiede in der Herkunft,

der Dosis und dem Reinheitsgrad des verwendeten Prolaktins beruhen.

Segaloff u.a. (1956) und Johnson (1974) berichteten, daß LH-Gabe bei hypophysektomierten Ratten die Synthese der Androgene in den Hoden stimuliert und Prolaktin hierbei einen synergistischen Einfluß besitzt. Die alleinige Verabreichung von Prolaktin steigert jedoch die Synthese von Testosteron nicht (Hafiez u.a. 1972).

Prolaktin spielt auch eine wesentliche Rolle bei der sexuellen Entwicklung und Reifung der maskulinen Tiere. Bei männlichen Ratten ist die Konzentration des Serumprolaktins zwischen dem 15. und 20. Tag ebenso wie die LH-Konzentration sehr niedrig. Am 25. Tag beobachtet man einen rapiden Anstieg der Prolaktin- und FSH-Werte, während die LH-Spiegel unverändert bleiben. Interessanterweise ist mit der Prolaktinerhöhung der rasche Beginn des Wachstums der Hoden und Samenblasen verknüpft (Negro Vilar u.a. 1973). Das Serumprolaktin bleibt dann vom 25. bis zum 50. Tag ziemlich konstant. Am 60. Tag wird ein signifikanter Anstieg auf adulte Werte bis zum 70. Lebenstag gemessen (Negro Vilar u.a. 1973). Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung des Prolaktins für die Ausbildung der Geschlechtsreife lieferten Hostetter und Piacsek (1977 b). Durch Verwendung von Antiprolaktinserum fanden sie, daß Prolaktin während der sexuellen Reifung auf die LH-Ausschüttung einen hemmenden, hingegen auf die Entwicklung der männlichen Anhangsdrüsen einen stimulierenden Einfluß ausübt.
Sowohl Aragona und Friesen (1975) als auch Barkey u.a. (1977) maßen bei unreifen 20-30 Tage alten männlichen Ratten die höchsten Bindungskapazitäten für die Prolaktinrezeptoren, während sie bei greisen 220-270 Tage alten Tieren nur noch etwa 10 % der Kapazität junger Tiere nachweisen konnten.
Von besonderer Wichtigkeit sind die Auswirkungen einer Orchidektomie auf den Prolaktinspiegel der Ratte, da Untersuchungen zur Regulation des Androgenrezeptors insbesondere an kastrierten Tieren vorgenommen werden.

Bei der kastrierten Ratte findet sich am 2. Tag nach Orchidektomie ein erhöhter Prolaktinspiegel (Shin u.a. 1974), während man bereits nach 7 Tagen verminderte Prolaktinkonzentrationen mißt (Hostetter und Piacsek 1977 b). Zu dieser Zeit ist auch die Zahl der spezifischen Prolaktinbindungsstellen bereits auf 1/6 abgefallen und das Prostatagewicht deutlich vermindert (Aragona und Friesen 1975, Kledzig u.a. 1976).
Durch Testosteronapplikation läßt sich sowohl der Serumprolaktinspiegel (Kalra u.a. 1973, Shin u.a. 1974) als auch die Konzentration hochaffiner Prolaktinrezeptoren wieder auf Normalwerte, wie bei intakten Tieren, anheben (Kledzig u.a. 1976).

Die Wirkung des Prolaktins auf die Prostata scheint nicht in allen Anteilen gleich zu sein. Grayhack und Lebowitz (1967) betonten, daß die Zunahme des Fruktose- und Zitronensäuregehaltes nach Gabe von Prolaktin nur in den lateralen Prostatalappen der untersuchten Ratten, nicht jedoch in den ventralen Anteilen feststellbar ist. Dagegen entdeckten Lawrence und Landau (1965), daß die ventrale Prostata hypophysektomierter Ratten signifikant weniger radioaktives Testosteron speichert als das Organ intakter Tiere. Lloyd u.a. (1973) fanden nach in vitro - Inkubation von Gewebeschnitten der Rattenprostata mit Schafsprolaktin nur eine Testosteronanreicherung in den anterioren und dorsalen Lappen, während Akkumulation und Metabolismus in den ventralen und lateralen Anteilen der Drüse nicht nachweisbar waren.

Auch in der menschlichen Prostata ist der Einfluß des Prolaktins auf Wachstum und Funktion festgestellt worden. Hier ist insbesondere die Bedeutung der Serumprolaktinkonzentration für das Wachstum des karzinomatös entarteten Gewebes wichtig. Farnsworth u.a. (1981) stimulierten mit TRH die Konzentration des Serumprolaktins bei Patienten mit benigner Prostatahypertrophie bzw. Prostatakarzinom und ermittelten keine Erhöhung der Konzentration des Serumtestosterons. Dagegen stieg die Konversion von Testosteron zu Dihydrotestosteron und dessen metabolische Clearancerate an.

Nach Jacobi u.a. (1979) wirkt Prolaktin synergistisch mit LH auf die Testosteronsynthese der Leydigzellen, steigert als Co-Hormon zum ACTH die adrenale Androgenbildung, fördert die extraprostatische Dihydrotestosteronbildung und erhöht die Affinität der Prostata für Androgene. Ferner werden Stoffwechsel und Utilisation der Androgene in den spezifischen Geweben regulierend beeinflußt.
Auf Grund dieser Wirkung des Prolaktins ist Bromocriptin, ein synthetisches - prolaktinsenkendes - Mutterkornalkaloid, in die Therapie des Prostatakarzinoms eingeführt worden. Bromocriptin senkt auch den Testosteronspiegel im Blut signifikant (Jacobi u.a. 1979).
Zusammenfassend läßt sich feststellen: Prolaktin besitzt an den akzessorischen Geschlechtsdrüsen eine permissive Wirkung auf Testosteron, indem es die Affinität der Prostata für Androgene erhöht (Farnsworth 1975).

4.4.2. Wird der Androgenrezeptor durch Testosteron und Prolaktin reguliert?

Diese Hypothese ist von Moeller u.a. in Vorbereitung) aufgestellt worden, nachdem gezeigt werden konnte, daß sich die Konzentration der cytosolischen Rezeptoren in Abhängigkeit vom Prolaktinspiegel verändert.
Durch Behandlung von 70 Tage alten Ratten mit Lisurid wurde der Prolaktinspiegel der Versuchstiere und gleichzeitig auch die Konzentration des cytosolischen Rezeptors gesenkt. Tiere, die auf Grund einer Behandlung mit Cyproteronacetat erhöhte Prolaktinwerte im Serum hatten, wiesen dagegen einen gesteigerten Gehalt an cytosolischen Androgenrezeptoren auf, während nukleäre Rezeptoren nicht nachweisbar waren.

Steht diese Modellvorstellung nun im Einklang mit anderen Versuchen, die zur Regulation der Androgenrezeptoren durchgeführt worden waren?

24 Stunden nach einer Orchidektomie findet man deutlich höhere cytosolische Rezeptorkonzentrationen als bei intakten Tieren, während nukleäre Rezeptoren nicht mehr meßbar sind (Grover und Odell 1975, Bruchovsky und Craven 1975, Van Doorn u.a. 1976).

Wie bereits referiert, läßt sich zu dieser Zeit eine ausgeprägte Erhöhung des Serumprolaktins feststellen (Shin u.a. 1974). 7 Tage nach der Kastration ist kein cytosolischer Rezeptor mehr nachweisbar (Bruchovsky und Craven 1975), gleichzeitig sind auch die Zahl der Prolaktinbindungsstellen und die Serumprolaktinkonzentration stark abgesunken (Shin u.a. 1974, Aragona und Friesen 1975). Durch Injektionen von Testosteron läßt sich die Konzentration cytoplasmatischer Rezeptoren wieder steigern (Van Doorn u.a. 1976). Unter dieser Behandlung wird jedoch auch die Konzentration des Serumprolaktins erhöht (Kalra u.a. 1973, Shin u.a. 1974) und auch die Konzentration der Prolaktinrezeptoren nimmt zu (Kledzig u.a. 1976).

Moeller u.a. (1981) beobachteten während der sexuellen Reifung männlicher Ratten um den 20. Tag eine hohe Rezeptorkonzentration im Cytosol, obwohl der Androgenspiegel im Serum noch niedrig war und erst später anstieg. Ein zweiter Rezeptorgipfel wurde für den 55. Tag angegeben, zu einer Zeit, wo die Testosteronkonzentration konstant verläuft.

Beide Befunde stehen gut in Einklang mit den von Negro Vilar u.a. (1973) referierten Ergebnissen über den Zusammenhang zwischen dem Prolaktinspiegel und der sexuellen Entwicklung der Ratte (vgl. 4.2.1.). Von weiterer Bedeutung sind die Messungen von Boesel u.a. (1980), die belegen, daß bei greisen (740 Tage) Tieren der gesamte Androgenrezeptorgehalt um ca 50 % im Vergleich zu jungen, reifen (150 Tage) Tieren vermindert ist.

Aragona und Friesen (1975) sowie Barkey u.a. (1977) berichteten, daß bereits bei 270 Tage alten Ratten die Konzentration der Prolaktinrezeptoren in der Prostata auf weniger als 10 % der Werte bei jungen Tieren abgesunken ist.

Eine Veränderung der Androgenrezeptorwerte läßt sich bei erwachsenen, reifen Tieren auch durch Melatonin-Injektionen bzw. durch kontinuierliche Dunkelheit erzeugen (Moeller u.a. 1983 a). Vordergründig scheint diese Konzentrationssteigerung des Androgenrezeptors durch die Epiphysenfunktion bzw. durch Melatonin allein reguliert zu werden. Es läßt sich jedoch zeigen, daß auch diese Effekte durch Änderungen des Serumprolaktins zustande gekommen sein können. Nach Kamberi u.a. (1971) erhöht Melatonin den Prolaktinspiegel bei männlichen Ratten, indem es die Sekretion des "prolactin-inhibiting factor" (PIF) hemmt. Konstante Dunkelheit bewirkt nicht nur einen Anstieg des Melatonins (Wurtman u.a. 1963), sondern führt auch zu einem deutlichen Anstieg der Serumprolaktinkonzentration (Relkin u.a. 1972).
Matt u.a. (1984) vermuteten, daß Prolaktin beim Goldhamster das Testosteron-feedback im Hypothalamus verändert.

Die bisher aufgezählten Versuchsergebnisse sind gut mit der Annahme erklärbar, daß Prolaktin zusammen mit Testosteron den Androgenrezeptor reguliert. Sullivan und Strott (1973) fanden 8 Tage nach einer Orchidektomie auch bei nebennieren- und hypophysenlosen Tieren einen neuen Anstieg des cytosolischen Androgenrezeptors, der noch 6 Wochen nach Kastration nachweisbar bleibt. Dieses erstaunliche Phänomen wurde, wenn auch in weniger ausgeprägter Form, von Blondeau u.a. (1975) sowie von Greenstein (1979) bestätigt. Kein Modell ist derzeit in der Lage, diese Beobachtung zu erklären.

4.4.3. Problematik der Versuche zur Androgenrezeptorregulation

Die Regulation der Androgenrezeptoren ist eng mit ihrer Wirkungsweise verknüpft. Leider ist das exakte Wirkprinzip noch völlig unzureichend bekannt. Ein großes Problem stellt die Tatsache dar, daß in einer Zielzelle sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern Androgenrezeptoren nachgewiesen werden können und noch immer nicht klar ist, welcher Zusammenhang zwischen

beiden Rezeptorformen besteht (Bruchovsky u.a. 1975). Wandert der cytoplasmatische Rezeptor nach Bindung des Hormons in den Zellkern und ist er damit ein wesentliches Element der Hormonwirkung (Jensen und De Sombre 1972), oder ist der Rezeptor im Cytoplasma nur ein Artefakt der Präparation (Karlson 1985)? Neuere Versuche mit schonenden Verfahren deuten darauf hin, daß zumindest die Östrogenrezeptoren locker mit dem Zellkern assoziiert sind und erst nach Aufbrechen der Zellen und nach Zellfraktionierung im Cytosol gefunden werden (Welshons u.a. 1984, Beato 1985). Während das Cytoplasma ein kompliziertes und intaktes Funktions- und Strukturelement einer Zelle darstellt, ist das Cytosol lediglich eine, durch Ultrazentrifugation gewonnene biochemische Präparationsform, bei der ein Teil der charakteristisch strukturierten Organellen zerstört und verloren gegangen ist. Die Begriffe Cytosol und Cytoplasma dürfen daher nicht synonym verwendet werden.

Weiterhin ist ungeklärt, ob der Kernrezeptor erneut wiederverwendet werden kann ("recycling") und in das Cytoplasma übertritt (Kassis und Gorski 1981, Rossini und Liao 1982), oder ob er eventuell enzymatisch im Kern oder im Cytoplasma abgebaut wird (Vedeckis u.a. 1980, Mac Donald u.a. 1982). Außerdem scheint der Androgenrezeptor durch einen ATP-abhängigen Prozess aktiviert bzw. inaktiviert zu werden. Aktivierung bedeutet in diesem Zusammenhang, daß der Rezeptor in einen hormonbindenden Zustand überführt wird; dieser Vorgang scheint reversibel zu sein (Grody u.a. 1982).
Die Inaktivierung des Rezeptors wird davon abgeleitet, daß bei Inkubation von Prostataschnitten in Gegenwart von Dinitrophenol, einem spezifischen Gift für die zelluläre Atmungskette und Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, ein rascher Abfall des meßbaren Androgenrezeptors die Folge ist. Wird Dinitrophenol wieder aus dem Inkubationsgemisch entfernt, so stellt man einen raschen Wiederanstieg des Androgenrezeptors - selbst in Gegenwart von Cycloheximid - fest (Rossini und Liao 1982).

Dieses Phänomen der Aktivierung könnte ein wesentliches Element der Rezeptorregulation darstellen und Wachstum und Funktion der Zielzellen steuern (Rossini und Liao 1982). Neuerdings ist nur im Zellkern von Prostatazellen eine entsprechende spezifische Kinase gefunden worden, die den Rezeptor durch Phosphorylierung bindungsfähig macht (Goueli u.a. 1984).
Tatsächlich liegt der eigentliche Wirkort der Rezeptoren im Zellkern, wo eine Steigerung der Transkription durch Genaktivierung nachzuweisen ist (Gorski und Gannon 1976).

Bereits 24 Stunden nach einer Orchidektomie findet man im Zellkern keinen Rezeptor mehr (Blondeau u.a. 1975, Boesel u.a. 1980), während die cytosolische Rezeptormenge um das 2-3-fache ansteigt (Bruchovsky und Craven 1975, Tezón u.a. 1982). Wie diese Verteilungsänderung zustande kommt, ist nach wie vor umstritten.
Es wurde vermutet, daß der cytosolische Rezeptor nach Absinken des Serumtestosterons einfach besser und leichter meßbar sei, da die Rezeptoren nicht mehr mit endogenem Hormon besetzt und einer radioaktiven Markierung eher zugänglich seien (Tremblay u.a. 1977, Greenstein 1979). Nach Ansicht anderer Autoren soll der nukleäre Rezeptor in das Cytoplasma zurückwandern (Van Doorn u.a. 1976). Für möglich gehalten wird aber auch eine Neusynthese des cytoplasmatischen Rezeptors, wobei allerdings nicht einzusehen ist, warum diese nur den cytoplasmatischen Pool betreffen sollte.
Nach Testosteronsubstitution läßt sich bei 16-18 Stunden zuvor kastrierten Tieren sowohl im Zellkern als auch im Cytosol eindeutig eine Rezeptorneusynthese nachweisen (Blondeau u.a. 1982, Tezón und Blaquier 1983).
Bei orchidektomierten Tieren wurde 30-120 Minuten nach Injektion von 150-200 µg Testosteron ein deutliches Absinken der Rezeptoren im Cytosol beobachtet, während im Kern plötzlich wieder hohe Rezeptormengen festgestellt wurden. Diese Umverteilung soll ausschließlich durch eine Translokation der cytoplasmatischen Rezeptoren in den Kern bewirkt werden (Van Doorn und Bruchovsky 1978, Ishii 1980, Tezón u.a. 1982).

Auf Grund der Feststellung, daß testosteronbehandelte Tiere sich von "normalen orchidektomierten Tieren" im K_D-Wert des cytosolischen Rezeptors unterscheiden, kommen Tezón und Blaquier (1983) zu dem Schluß, daß die cytoplasmatische Rezeptorpopulation mindestens aus zwei unterscheidbaren Rezeptorarten zusammengesetzt sein muß. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß ein Teil der cytosolischen Rezeptoren trotz maximaler Testosteronsubstitution nicht in den Zellkern transloziert werden kann (Ishii 1980, Tezón u.a. 1982). Diese Beobachtung wird von Feit und Muldoon (1983) bestätigt.
Eine gleichzeitige Gabe des Antiandrogens Cyproteronacetat blockiert die durch Dihydrotestosteron induzierte "Kernwanderung" (Ishii 1980, Tezón u.a. 1982, Moeller u.a. in Vorbereitung). Boesel u.a. (1980) fanden dagegen keine Anhaltspunkte, wonach der Kernrezeptor aus dem cytosolischen Pool hervorgeht. Diese Aussage begründeten sie damit, daß die Totalkonzentration des cytosolischen Rezeptors nicht verändert wird, obwohl der nukleäre Rezeptorgehalt ansteigt. Außerdem konnten sie im dorsolateralen Lappen der Prostata 24 Stunden nach der Kastration keinen cytosolischen Rezeptor mehr nachweisen, obwohl auch hier der Anstieg der Kernrezeptoren nach Testosteronapplikation exakt dieselbe Kinetik wie im ventralen Prostataanteil aufwies.

Zum Teil lassen sich diese sehr widersprüchlichen Ergebnisse auf eine unterschiedliche Meßtechnik beim Nachweis der Rezeptoren zurückführen, zumal einige Arbeitsgruppen nur freie Rezeptoren messen, während andere durch Austauschassay auch mit endogenem Hormon besetzte Rezeptoren nachweisen.

4.5. Schlußfolgerung

In der männlichen Ratte läßt sich ein circadianer Rhythmus für Prolaktin nachweisen. Bei diesen Tieren hat Prolaktin zusammen mit Testosteron einen synergistischen Effekt auf Wachstum und Funktion der Prostata, indem es die Verfügbarkeit der Androgene im Organ steigert.
Moeller u.a. (in Vorbereitung) zeigten, daß ein dauerhaftes Anheben der Serumprolaktinwerte die meßbare Konzentration der cytosolischen Androgenrezeptoren in der Rattenprostata erhöht.
In der vorliegenden Arbeit sind kurzfristige Erhöhungen der Konzentration des Serumprolaktins jedoch nicht in der Lage, Zahl und Menge der Androgenrezeptoren signifikant zu verändern. Möglicherweise erfordert die Neusynthese bzw. Rezeptorkonzentrationsänderung durch Prolaktin einen über längere Zeit gleichmäßig erhöhten Serumspiegel. Messungen des cytosolischen Androgenrezeptors zu verschiedenen Tageszeiten legen den Schluß nahe, daß -ähnlich dem Östrogenrezeptor- circadiane Rezeptorschwankungen bestehen. Es ist fraglich, ob die Konzentration des cytosolischen Androgenrezeptors einen physiologischen Funktionszustand der Zelle beschreibt oder möglicherweise ein Artefakt der Präparation ist.

5. Zusammenfassung

Fragestellung:

1.) Ändert sich die Konzentration des cytosolischen Androgenrezeptors (AR) der ventralen Rattenprostata mit der Tageszeit?

2.) Ist die Konzentration des AR mit der Konzentration des zirkulatorischen Prolaktins (PRL) korreliert?

Methode:

Bei 70 Tage alten Wistar-Ratten, die über 10 Tage hinweg von 19^{30} - 7^{30} im Dunkeln gehalten worden waren, wurde die Konzentration des AR in der Prostata mit der Methode von Moeller u.a. (1983 b) sowie die Prolaktinkonzentration im Serum mit den Reagenzien des NIAMDD gemessen.

Ergebnisse:

Uhrzeit	1^{15}	7^{00}	8^{00}	9^{30}
Prolaktin (ng/ml Serum)	110 ± 67	194 ± 138	34 ± 15	35 ± 12
Rezeptor (fmol/mg DNA)	114 ± 102	287 ± 229	224 ± 82	103 ± 85

Diskussion:

Die einfache Varianzanalyse zeigt, daß signifikante Änderungen der PRL- und AR-Konzentration mit der Zeit stattfinden. Bei der AR-Konzentration können die zeitlichen Unterschiede im Scheffé-Test jedoch nicht identifiziert werden. Die AR-Konzentration korreliert nur um 7^{00} mit der Serum PRL-Konzentration ($R_{korr}=0,757$, $p < 0,05$).

Schlußfolgerung:

Messungen des cytosolischen AR zu verschiedenen Tageszeiten legen den Schluß nahe, daß ähnlich wie beim Östrogenrezeptor circadiane Rezeptorschwankungen bestehen. Kurzfristige Erhöhungen der Konzentration des Serum-PRL steigern Zahl und Menge des AR nicht signifikant.

6. Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
c-AMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
cpm	counts per minute
DHT	Dihydrotestosteron, 5α-Androstan-17ß- ol-3-on
DNA	Deoxyribonucleic acid
dpm	desintegrations per minute
DST	Dithioerythrit-Sucrose-Tris
EDTA	Ethylendiamintetraacetate
FSH	Follitropin
H	Koeffizient von Kruskal und Wallis
^{3}H-DHT	Tritium markiertes Dihydrotestosteron
HCL	Salzsäure
IU	International units
K_D	Dissoziationskonstante
$\|L\|$	Ligandenkonzentration
$\|L\|_t$	Gesamtligandenkonzentration
LH	Lutropin, luteotropes Hormon
M	mol/l
m-RNA	messenger ribonucleic acid
n	Anzahl der Versuche
NADase	NAD^+-Nukleosidase
NIAMDD	National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases
$\|R\|$	Rezeptorkonzentration
R 1881	Methyltrienolon
$\|RL\|$	Konzentration der Rezeptor-Liganden-Komplexe
R_{korr}	Spearmans-Rangkorrelationskoeffizient
rpm	rounds per minute
S	Svedberg-Konstante
s	Standardabweichung

SH	Sulfhydryl
Tris	Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
$\bar{x}$	Mittelwert
$\tilde{x}$	Median

7. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1983)
Molecular biology of the cell. Chemical signaling between cells, chap. 13, 717-765.
Garland Publishing Inc., New York and London

Amenomori, Y., Chen, C.L., Meites, J. (1970)
Serum prolactin levels in rat during different reproductive states.
Endocrinology 86, 505-510

Anderson, K.M., Liao, Sh. (1968)
Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei.
Nature 219, 277-279

Aragona, C., Friesen, H.G. (1975)
Specific prolactin binding sites in the prostate and testis of rats.
Endocrinology 97, 677-684

Asano, M., Kanzaki, S., Sekiguchi, E., Tasaka, T. (1971)
Inhibition of prostatic growth in rabbits with antiovine prolactin serum.
Journal of Urology 106, 248-252

Asselin, J., Labrie, F., Gourdeau, Y., Bonne, C., Raynaud, J.P. (1976)
Binding of |^{3}H|-methyltrienolone (R 1881) in rat prostate and human benign prostate hypertrophy (BPH).
Steroids 28, 449-459

Asselin, J., Melancon, R., Gourdeau, Y., Labrie, F., Bonne, C., Raynaud, J.P. (1979)
Specific binding of |^{3}H|-methyltrienolone to both progestin.

and androgen binding components in human benign prostatic hypertrophy (BPH).
J. Steroid Biochem. 10, 483-486

Attardi, B., Geller, L.N., Ohno, S. (1976)
Androgen and estrogen receptors in brain cytosol from male, female and testicular feminized (Tfm/y) mice.
Endocrinology 98, 864-874

Attramadal, A., Tveter, K.J., Weddington, S.C., Djoseland, O., Naess, O., Hansson, V., Torgersen, O. (1975)
Androgen binding and metabolism in the human prostate.
Vitamins and Hormons 33, 247-264

Barkey, R.J., Shani, J., Amit, T., Barzilai, D. (1977)
Specific binding of prolactin to seminal vesicle, prostate and testicular homogenates of immature, mature and aged rats.
J. Endocrinology 74, 163-173

Bartke, A. (1974)
Effect on inhibitors of pituitary prolactin release on testicular cholesterol stores, seminal vesicle weight, fertility and lactation in mice .
Biol. Reproduction 11, 319-325

Bartsch, W., Horst, H.-J., Becker, H., Nehse, G. (1977)
Sex hormone binding globulin binding capacity, testosterone, 5- α -dihydrotestosterone, oestradiol and prolactin in plasma of patients with prostatic carcinoma under various types of hormonal treatment .
Acta Endocrinologica 85, 650-664

Baulieu, E.-E., Jung, J. (1970)
A prostatic cytosol receptor.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 38, 599-606

Beato, M. (1985)

Die Wirkung der Steroidhormone im Zellkern.
Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte
113. Versammlung 1984, 437-444
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H. Stuttgart

Bell, P.A., Munck, A. (1973)
Steroid-binding properties and stabilization of cytoplasmic glucocorticoid receptors from rat thymus cells.
Biochem. J. 136, 97-107

Birnbaumer, L., O'Malley, B.W. (1976)
Receptors and hormone action, vol. 1.
Academic Press, New York

Blaquier, J.A. (1971)
Selective uptake and metabolism of androgens by rat epididymis. The presence of a cytoplasmatic receptor.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 1076-1082

Blondeau, C., Corpéchot, C., Le Goascogne, C., Baulieu, E.E., Robel, P. (1975)
Androgen receptors in the rat ventral prostate and their hormonal control.
Vitamins and Hormons 33, 319-334

Blondeau, J.P., Baulieu, E.E., Robel, P.(1982)
Androgen-dependent regulation of androgen nuclear receptor in the ventral prostate.
Endocrinology 110, 1926-1932

Boesel, R.W., Klipper, R.W., Shain, S.A. (1980)
Androgen regulation of androgen receptor content and distribution in the ventral and dorsolateral prostates of aging AXC rats.
Steroids 35, 157-177

Bonne, C., Raynaud, J.-P. (1975)
Methyltrienolone, a specific ligand for cellular androgen receptors.
Steroids 26, 227-232

Bonne, C., Raynaud, J.-P. (1976)
Assay of androgen binding sites by exchange with methyltrienolone (R 1881).
Steroids 27, 497-507

Brandis, H., Otte, H.J. (1984)
Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie.
Gustav Fischer, Stuttgart, New York

Bruchovsky, N., Wilson, J.D. (1968)
The intranuclear binding of testosterone and 5α-androstan-17ß-ol-3-one by rat prostate.
J. Biol. Chem. 243, 5953-5960

Bruchovsky, N., Craven, Sh. (1975)
Prostatic involution: effect on androgen receptors and intracellular androgen transport.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 62, 837-843

Bruchovsky, N., Rennie, P.S., Vanson, A. (1975)
Studies on the regulation of the concentration of androgens and androgen receptors in nuclei of prostatic cells.
Biochem. Biophys. Acta 394, 248-266

Burton, K. (1956)
A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.
Biochem. J. 62, 315-322

Caroll, S.L., Rowley, D.R., Chang, C.H., Tindall, D.J. (1984)
Exchange assay for androgen receptors in the presence of molybdate.

J. Steroid Biochem. 21, 353-359

Castañeda, E., Liao, Sh.(1975)
The use of anti-steroid antibodies in the characterization of steroid receptors.
J. Biol. Chem. 250, 883-888

Chamness, G.C., Mc Guire, W.L. (1975)
Scatchard plots: common errors in correction and interpretation.
Steroids 26, 538-542

Chan, L., O'Malley, B.W. (1978)
Steroid hormone action: recent advances.
Ann. of Intern. Med. 89, 694-701

Chang, Ch.H., Rowley, D.R., Tindall, D.J. (1983)
Purification and characterization of the androgen receptor from rat ventral prostate.
Biochem. 22, 6170-6175

Chang, Ch.H., Tindall, D.J. (1983)
Physicochemical characterization of the androgen receptor in rat uterine cytosol.
Endocrinology 113, 1486-1493

Clark, A.J. (1933)
The mode of the action of drugs on cells.
Arnold Press, London

Clark, C.R. (1984)
The cellular distribution of steroid hormone receptors: have we got it right?
TIBS, 207-208

Cooper, T.G. (1981)
Biochemische Arbeitsmethoden.
Reinigung von Proteinen, Kap. 10, 344-353

de Gruyter, Berlin, New York

Coty, W.A. (1980)
Reversible dissociation of steroid hormone receptor complexes by mercurial reagents.
J. Biol. Chem. 255, 8035-8037

Cunningham, G.R., Tindall, D.J., Means, A.R. (1979)
Differences in steroid specificity for rat androgen binding protein and the cytoplasmic receptor.
Steroids 33, 261-276

Davies, J., Naftolin, F., Ryan, K.J., Siu, J. (1975)
Estradiol receptors in the pituitary and anterior hypothalmus of the rat: measurement by agar gel electrophoresis.
Steroids 25, 591-609

Davies, P., Thomas, P., Griffiths, K. (1976)
The influence of steroid receptor complexes on the stages of transcription of target-tissue chromatin.
J. Steroid Biochem. 7, 993-1000

Davies, P., Thomas, P., Griffiths, K. (1977)
Measurement of free and occupied cytoplasmic and nuclear androgen receptor sites in rat ventral prostate gland.
J. Endocrinology 74, 393-404

Delettré, J., Mornon, J.P., Lepicard, G., Ojasoo, T., Raynaud, J.P. (1980)
Steroid flexibility and receptor specificity.
J. Steroid Biochem. 13, 45-59

Dische, Z. (1930)
Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonucleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen.
Mikrochemie 8, 4-32

Dixon, W.J. (1950)
Analysis of extreme values .
Ann. Math. Statist. 21, 488-506

Dixon, W.J. (1953)
Processing data for outliers .
Biometrics 9, 74-89

Van Doorn, E., Craven, Sh., Bruchovsky, N. (1976)
The relationship between androgen receptors and the hormonally controlled responses of rat ventral prostate.
J. Biochem. 160, 11-21

Van Doorn, E., Bruchovsky, N. (1978)
Mechanisms of replenishment of nuclear androgen receptor in rat ventral prostate .
J. Biochem. 174, 9-16

MacDonald, R.G., Okulicz, W.C., Leavitt, W.W. (1982)
Progesterone-induced inactivation of nuclear estrogen receptor in the hamster uterus is mediated by acid phosphatase .
Biochem. Biophys. Res. Comm. 104, 570-576

Dubé, J.Y., Chapdelaine, P., Tremblay, R.R., Bonne, C., Raynaud, J.P. (1976)
Comparative binding specificity of methyltrienolone in human and rat prostate .
Hormone Res. 7, 341-347

Dunn, J.D., Arimura, A., Scheving, L.E. (1972)
Effect of stress on circadian periodicity in serum LH and prolactin concentration.
Endocrinology 90, 29-33

Euker, J.S., Meites, J., Riegle, G.D. (1975)
Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats.

Endocrinology 96, 85-92

Fang. S., Anderson, K.M., Liao, Sh.(1969)
Receptor proteins for androgens.
On the role of specific proteins in selective retention of 17ß-hydroxy-5α -androstan-3-one by rat ventral prostate in vivo and in vitro.
J. Biol. Chem. 244, 6584-6595

Fang, S., Liao, Sh.(1971)
Androgen receptors.
Steroid- and tissue-specific retention of a 17ß-hydroxy-5α -androstan-3-one-protein complex by the cell nuclei of ventral prostate .
J. Biol. Chem. 246, 16-24

Farnsworth, W.E. (1975)
Role of lactogen in prostatic physiology.
Urological Research 3, 129-132

Farnsworth, W.E., Slaunwhite, jr., W.R., Sharma, M., Oseko, F., Brown, J.R., Gonder, M.J., Cartagena, R. (1981)
Interaction of prolactin and testosterone in the human prostate.
Urological Research 9, 79-88

Feherty, P., Farrer-Brown, G., Kellie, A.E. (1971)
Oestradiol receptors in carcinoma and benign disease of the breast: an in vitro assay .
British Journal of Cancer 25, 697-710

Feit, E.I., Muldoon, Th.G. (1983)
Differences in androgen-binding properties of the two molecular forms of androgen receptor in rat ventral prostate cytosol.
Endocrinology 112, 592-600

Fonzo, D., Angeli, A., Sivieri, R., Andriolo, S., Frajria, R., Ceresa, F. (1977)

Hyperprolactinemia in girls with idiopathic precocious puberty under prolonged treatment with cyproterone acetate .
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45, 164-168

Gaubert, C.M., Tremblay, R.R., Dubé, J.Y., (1980)
Effect of sodium molybdate on cytosolic androgen receptors in rat prostate .
J. Steroid Biochem. 13, 931-937

Gehring, V., Tompkins, G.M. (1974)
Characterization of a hormone receptor defect in the androgen-insensitivity mutant .
Cell 2, 59-64

Geller, J., Cantor, Th., Albert, J. (1975)
Evidence for a specifice dihydrotestosterone-binding cytosol receptor in the human prostate .
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 854-862

Golder,M.P.,Boyns, A.R., Harper, M.E., Griffiths, K. (1972)
An effect of prolactin on prostatic adenylate cyclase activity.
J. Biochem. 128, 725-727

Gore, M.B.R., Baron, D.N. (1965)
3α -hydroxy steroid dehydrogenation in subcellular fractions of the ventral prostate and other tissues .
J. Endocrinology 33, 353-363

Gorski, J., Toft, D., Shyamala, G., Smith, D., Notides, A. (1968)
Hormone receptors: studies on the interaction of estrogen with the uterus .
Rec. Progress in Horm. Res. 24, 45-80

Gorski, J., Gannon, F., (1976)
Current models of steroid hormone action: a critique .
Ann. Rev. Physiol. 38, 425-456

Goueli, S.A., Holtzman, J.L., Ahmed, K. (1984)
Phosporylation of the androgen receptor by a nuclear c amp-independent protein kinase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 123, 778-784

Gräf, K.-J., Neumann, F., Horowski, R. (1976)
Effect of the ergot derivative lisuride hydrogen maleate on serum prolactin concentrations in female rats.
Endocrinology 98, 598-605

Granberg, J.P., Ballard, P.L. (1977)
The role of sulfhydryl groups in the binding of glucocorticoid by cytoplasmic receptors of lung and other mammalian tissues.
Endocrinology 100, 1060-1068

Grayhack, J.T., Bunce, P.L., Kearns, J.W., Scott, W.W. (1955)
Influence of the pituitary on prostatic response to androgen in the rat.
Bull. Hopkins Hosp. 96, 154-163

Grayhack, J.T., Lebowitz, J.M. (1967)
Effect of prolactin on citric acid of lateral lobe of prostate of sprague-dawley rat.
Invest. Urol. 5, 87-94

Greenstein, B.D. (1979)
Androgen receptors in the rat brain, anterior pituitary gland and ventral prostate gland: effects of orchidectomy and ageing.
J. Endocrinology 81, 75-81

Grippo, J.F., Holmgren, A., Pratt, W.B. (1985)
Proof that the endogenous, heat-stable glucocorticoid receptor-activating factor is thioredoxin.
J. Biol. Chem. 260, 93-97

Grody, W.W., Schrader, W.T., O'Malley, B.W. (1982)
Activation, transformation, and subunit structure of steroid

hormone receptors.
Endocrine Reviews 3, 141-163

Grover, P.K., Odell, W.D. (1975)
Correlation of in vivo and in vitro activities of some naturally occurring androgens using a radioreceptor assay for 5α-dihydrotestosterone with rat prostate cytosol receptor protein.
J. Steroid Biochem. 6, 1373-1379

Hafiez, A.A., Bartke, A., Lloyd, C.W. (1972)
The role of prolactin in the regulation of testes function: the synergistic effects of prolactin and luteinizing hormone on the incorporation of (1-^{14}C) - acetate into testosterone and cholesterol by testes from hypophysectomized rats in vitro.
J. Endocrinology 53, 223-230

Harms, P.G., Langlier, P., McCann, S.M. (1975)
Modification of stress-induced prolactin release by dexamethasone or adrenalectomy.
Endocrinology 96, 475-478

Heyns, W., Verhoeven, G., De Moor, P. (1976)
A comparative study of androgen binding in rat uterus and prostate.
J. Steroid Biochem. 7, 987-991

Heyns, W., De Moor, P. (1977)
Prostatic binding protein.
A steroid-binding protein secreted by rat prostate.
Eur. J. Biochem. 78, 221-230

Høisaeter, P.A. (1973)
The androgen cytosol receptor in the ventral prostate of the rat. Methodological problems.
Biochem. Biophys. Acta 317, 492-499

Hostetter, M.W., Piacsek, B.E. (1977 a)

Patterns of pituitary and gonadal hormone secretion during a 24 hour period in the male rat.
Biol. Reproduction 16, 495-498

Hostetter, M.W., Piacsek, B.E. (1977 b)
The effect of prolactin deficiency during sexual maturation in the male rat.
Biol. Reproduction 17, 574-577

Hu, A-Li., Loor, R.M., Chamberlin, L., Wang, T.Y. (1978)
Study of androgen-binding cytosol proteins from rat prostate: purification of androgen receptor.
Arch. Biochem. Biophys. 185, 134-141

Hughes, A., Jacobson, H.I., Wagner, R.K., Jungblut, P.W. (1976)
Ovarian-independent fluctuations of estradiol receptor levels in mammalian tissues.
Mol. Cell. Endocrinology 5, 379-388

Ichii, Sh. (1980)
Changes in the cytoplasmic androgen receptor of rat ventral prostate after administration of androgens, antiandrogens and anabolic steroids.
Endocrinologica Japonica 27, 483-493

Jacob, A.F., Zapf, J., Bürgi, H. (1978)
Allgemeine Endokrinologie, Hormonrezeptoren, 5-17 in: Labhardt, A. (Hrgb.): Klinik der inneren Sekretion.
3. Auflage, Springer, Berlin, New York, Heidelberg

Jacobi, G.H., Kurth, K.H., Altwein, J.E. (1979)
Effekt von Bromocriptin beim Prostatakarzinom:
Testosteronstoffwechsel in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad.
Urologie A 18, 91-98

Jensen, E.V., Jacobson, H.I. (1962)

Basic guides to the mechanism of estrogen action.
Rec. Progress in Horm. Res. 18, 387-408

Jensen, E.V., De Sombre, E.R. (1972)
Mechanism of action of the female sex hormones.
Ann. Rev. Biochem. 789, 203-231

Johnson, D.C. (Introduced by Brown, jr., E.B.) (1974)
Temporal augmentation of LH by prolactin in stimulation of androgen production by the testes of hypophysectomized male rats (37860).
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 145, 610-613

Kalra, P.S., Fawcett, C.P., Krulich, L., McCann, S.M. (1973)
The effects of gonadal steroids on plasma gonadotropins and prolactin in the rat.
Endocrinology 92, 1256-1268

Kamberi, I.A., Mical, R.S., Porter, J.C. (1971)
Effects of melantonin and serotonin on the release of FSH and prolactin.
Endocrinology 88, 1288-1293

Kanizir, D., Ribarac-Stepić, N., Trajković, D., Blečić, G., Radojćić, M. (1979)
The structure and regulatory function of cortisol receptor -1: extragenomic effects dependent on the cortisol receptor activation.
J. Steroid. Biochem. 11, 389-400

Karlson, P. (1979)
Hormonrezeptoren und Hormonwirkung.
Klin. Wochenschr. 57, 607-612

Karlson, P. (1980)
Biochemie.
G. Thieme, Stuttgart, New York

Karlson, P. (1982)
Was sind Hormone? Der Hormonbegriff in Geschichte und Gegenwart.
Naturwissenschaften 69, 3-14

Karlson, P. (1983)
Why are so many hormones steroids?
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1067-1087

Karlson, P. (1985)
Evolution der chemischen Kommunikation im Tierreich.
Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte
113 Versammlung 1984, 23-42
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H. Stuttgart

Kassis, J.A., Gorski, J. (1981)
Estrogen receptor replenishment.
J. Biol. Chem. 256, 7378-7382

Keenan, E.J., Thomas, J.A. (1975)
Effects of testosterone and prolactin or growth hormone on the accessory sex organs of castrated mice .
J. Endocrinology 64, 111-115

King, W.J., Greene, G.L. (1984)
Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells.
Nature 307, 745-747

Kirchhoff, J., Soffie, M., Rousseau, G.G. (1979)
Differences in the steroid-binding site specificities of rat prostate androgen receptor and epididymal androgen-binding protein (ABP) .
J. Steroid Biochem. 10, 487-497

Kizer, J.S., Zivin, J.A., Jacobowitz, D.M., Kopin, I.J. (1975)
The nyctohemeral rhythm of plasma prolactin: effects of

ganglionectomy, pinealectomy, constant light, constant darkness or 6-OH-dopamine administration.
Endocrinology 96, 1230-1240

Kledzik, G.S., Marshall, S., Campbell, G.A., Gelato, M., Meites, J. (1976)
Effects of castration, testosterone, estradiol and prolactin on specific prolactin-binding activity in ventral prostate of male rats.
Endocrinology 98, 373-379

Kovacs, W.J., Griffin, J.E., Wilson, J.D. (1983)
Transformation of human androgen receptors to the deoxyribonucleic acid-binding state.
Endocrinology 113, 1574-1581

Krauß, G.J., Krauß, G. (1979)
Experimente zur Chromatographie.
Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin

Krieg, M. (1976)
Characterization of the androgen receptor in the skeletal muscle of the rat.
Steroids 28, 261-274

Krieg, M., Steins, P., Szalay, R., Voigt, K.D. (1974)
Charakterization of a specific androgen receptor in rat prostate cytosol by agargel electrophoresis. In vivo and in vitro studies.
J. Steroid. Biochem. 5, 87-92

Krieg, M., Horst, H.-J., Sterba, M.-L. (1975)
Binding and metabolism of 5α-androstane-3α, 17ß-diol and of 5α-androstane-3ß, 17ß-diol in the prostate, seminal vesicles and plasma of male rats: studies in vivo and in vitro.
J. Endocrinology 64, 529-538

Krieg, M., Voigt, K.D. (1976)

In vitro binding and metabolism of androgens in various organs: a comparative study.
J. Steroid. Biochem. 7, 1005-1012

Krieg, M., Bartsch, W., Herzer, S., Becker, H., Voigt, K.D. (1977)
Quantification of androgen binding, androgen tissue levels, and sex hormone-binding globulin in prostate, muscle and plasma of patients with benign prostatic hypertrophy.
Acta Endocrinologica 86, 200-215

Krulich, L., Hefco, E., Illner, P., Read, C.B. (1974)
The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation.
Neuroendocrinology 16, 293-311

Kuch, A. (Dissertation in Vorbereitung)
Tübingen

Labrosse, K., Haus, E., Lakatua, D.J., Halberg, F. (1978)
Circadian rhythm in mammary cytoplasmic estrogen receptor content in mice with and without pituitary isografts and demonstrated differences in breast cancer risk.
Proceedings of the 60 th annual meeting of the endocrine society, Miami, Florida
Abstract 661, 407

Langley, J.N. (1905)
On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and curare.
J. Physiol. (London) 33, 374-413

Lawrence, A.M. Landau, R.L. (1965)
Impaired ventral prostate affinity for testosterone in hypophysectomized rats.
Endocrinology 77, 1119-1125

Levey, G.S., Robinson, A.G. (1982)
Introduction to the general principles of hormone-receptor interactions.
Metabolism 31, 639-645

Liao, Sh. (1975)
Cellular receptors and mechanisms of action of steroid hormones.
Int. Rev. Cytol. 41, 87-172

Liao, Sh., Liang, T., Fang, S., Castañeda, E., Shao, T.C. (1973)
Steroid structure and androgenic activity.
Specificities involved in the receptor binding and nuclear retension of various androgens.
J. Biol. Chem. 248, 6154-6162

Liao, Sh., Rossini, G.P., Hiipakka, R.A., Chen, Ch. (1980)
Factors, that can control the interaction of the androgen-receptor complex with the genomic structure in the rat prostate, 61-71 in: Bresciani, F. (ed.): Perspectives in steroid receptor research.
Raven Press, New York

Lloyd, J.W., Thomas, J.A., Mawhinney, M.G. (1973)
A difference in the in vitro accumulation and metabolism of testosterone -1,2-^{3}H by the rat prostate gland following incubation with ovine or bovine prolactin.
Steroids 22, 473-483

Lowry, R.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275

Mainwaring, W.I.P. (1969)
A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate.
J. Endocrinology 45, 531-541

Mainwaring, W.I.P. (1977)
The mechanism of action of androgen, monographs on endocrinology vol. 10.
Springer, New York, Heidelberg, Berlin

Mainwaring, W.I.P., Peterken, B.M. (1971)
A reconstituted, cell free system for the specific transfer of steroid-receptor complexes into nuclear chromatin isolated from the rat ventral prostate gland.
Biochem. J. 125, 285-295

Mainwaring, W.I.P., Irving, R. (1973)
The use of deoxyribonucleic acid-cellulose chromatography and isoelectric focusing for the characterization and partial purification of steroid-receptor complexes.
Biochem. J. 134, 113-127

Mainwaring, W.I.P., Mangan, F.R. (1973)
A study of the androgen receptors in a variety of androgen-sensitive tissues.
J. Endocrinology 59, 121-139

Mainwaring, W.I.P., Milroy, E.J.G. (1973)
Characterization of the specific androgen receptors in the human prostate gland.
J. Endocrinology 57, 371-384

Malkinson, A.M. (1975)
Hormone action.
Chapman and Hall Ltd., London

O'Malley, B.W., Roop, D.R., Lac, E.C., Nordstrom, J.L., Catterall, J.F., Swaneck, G.E., Colbert, D.A., Tsai, M.J., Dugaiczyk, A., Woo, S.L.C. (1979)
The ovalbumin gene: organization, structure, transcription and regulation.
Rec. Progress in Horm. Res. 35, 1-46

Matt, K.S., Bartke, A., Soares, M.J., Talamantes, F., Herbert, A., Hogan, M.P. (1984)
Does prolactin modify testosterone feedback in the hamster? Suppresion of plasma prolactin inhibits photoperiod-induced decrease in testosterone feedback sensitivity.
Endocrinology 115, 2098-2103

Mattheij, J.A.M., van Pijkeren, Th.A. (1977)
Plasma prolactin in undisturbed cannulated male rats; effects of perphenazine, frequent sampling, stress and castration plus oestrone treatment.
Acta Endocrinologica 84, 51-61

Mattheij, J.A.M., Swarts, J.J.M. (1978)
Circadian variations in the plasma concentration of prolactin in the adult male rat.
J. Endocrinology 79, 85-89

Mobbs, B.G., Johnson, I.E., Connolly, J.G., Clark, A.F. (1978)
Androgen receptor assay in human benign and malignant prostatic tumor cytosol using protamine sulphate precipitation.
J. Steroid Biochem. 9, 289-301

Moeller, H. (1982)
Bestimmung von Androgenrezeptoren durch Bestimmung von ^{3}H-Dihydrotestosteron in Gegenwart von NAD^{+} - Nukleosidase.
Attempo, Tübingen

Moeller, H., Lander. K., Mates, G., Gupta, D. (1981)
Prostatic concentrations of androgens and androgen receptors in developing rats.
Ped. Res. 15, 1565

Moeller, H., Koz, A., Rödl, W., Frick, H.-J., Gupta, D. (1983a)
Role of the pineal gland in the regulation of prostatic androgen receptors in pubertal and mature rats.
Res. Exp. Med. 183, 157-165

Moeller, H., Oettling, G., Fiederer, B., Brügmann, G. (1983b)
A quantitative assay for the cytoplasmic androgen receptor using [^{3}H] dihydrotestosterone in the presence of NAD^+-nucleosidase.
Acta Endocrinologica 102, 153-160

Moeller, H., Schneider, Ch., Goecke, B. (Publikation in Vorbereitung)
Control of prostatic androgen receptor by prolactin?

Menon, M., Tananis, C.E., Hicks, L.L., Hawkins, E.F., McLoughlin, M.G., Walsh, P.C. (1978)
Characterization of the binding of a potent synthetic androgen, methyltrienolone, to human tissues.
J. Clin. Invest. 61, 150-162

De Moore, P., Verhoeven, G., Heyns, W. (1975)
A comparative study of the androgen receptor apparatus in adult rodents.
J. Steroid Biochem. 6, 437-442

Mowszowicz, I., Bardin, C.W. (1974)
In vitro androgen metabolism in mouse kidney: high 3-keto-reductase (3α-hydroxysteroid dehydrogenase) activity relative to 5α-reductase.
Steroids 23, 793-807

Negro-Vilar, A., Krulich, L., McCann, S.M. (1973)
Changes in serum prolactin and gonadotropins during sexual development of the male rat.
Endocrinology 93, 660-664

Nielsen, C.J., Sando, J.J., Pratt, W.B. (1977)
Evidence that dephosphorylation inactivates glucocorticoid receptors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1398-1402

Niswender, G.D., Chen, C.L., Midgely, A.R. jr., Meites, J., Ellis, S. (1969)
Radioimmunoassay for rat prolactin.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 130, 793-798

Noma, K., Nakao, K., Sato, B., Nishizawa, Y., Matsumoto, K., Yamamura, Y. (1980)
Effect of molybdate on activation and stabilization of steroid receptors .
Endocrinology 107, 1205-1211

Nozu, K., Tamaoki, B.-I. (1975)
Formation, nuclear incorporation and enzymatic decomposition of androgen-receptor complex of rat prostate.
J. Steroid Biochem. 6, 1319-1323

Van Obberghan, E., Roth, J. (1981)
The insulin receptor and it's function, 7-40 in: Lefkowitz, R.J. (ed): Receptor regulation.
Chapman and Hall Ltd.,London

Oettling, G. (Dissertation in Vorbereitung)
Tübingen

Parker, M.G., Scrace, G.T., Mainwaring, W.I.P. (1978)
Testosterone regulates the synthesis of major proteins in rat ventral prostate .
Biochem. J. 170, 115-121

Pousette, Å., Snochowski, M., Bression, D., Högberg, B., Gustafsson, J.-Å. (1979)
Partial characterization of |^{3}H| methyltrienolone binding in rat prostate cytosol .
Biochem. Biophys. Acta 582, 358-367

Rees, A.M., Bell, P.A. (1975)
The involvement of receptor sulphydryl groups in the binding

of steroids to the cytoplasmic glucocorticoid receptor from rat thymus.
Biochem. Biophys. Acta 411, 121-132

Rehfeld, N., Reichelt, D. (1973)
Analytische und präparative Methoden der Klinischen Biochemie. Verlag Chemie, Weinheim

Relkin, R., Adachi, M., Kahan S.A. (1972)
Effects of pinealectomy and constant light and darkness on prolactin levels in the pituitary and plasma and on pituitary ultrastructure of the rat.
J. Endocrinology 54, 263-268

Rillema, J.A. (1975)
Possible role of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in mediating effect of prolactin on RNA synthesis in mammary gland explants of mice.
Nature 253, 466-467

Ritzen, E.M., Nayfeh, S.N., French, F.S., Dobbins, M.C. (1971)
Demonstration of androgen-binding components in rat epididymis cytosol and comparsion with binding components in prostate and other tissues.
Endocrinology 89, 143-151

Ritzen, E.M., French, F.S., Weddington, S.C., Nayfeh, S.N. (1974)
Steroid binding polyacrylamid gels - quantitation at steady state conditions.
J. Biol. Chem. 249, 6597-6604

Rønnekleiv, O.K., Krulich, L., McCann, S.M. (1973)
An early morning surge of prolactin in the male rat and its abolition by pinealectomy.
Endocrinology 92, 1339-1342

Rønnekleiv, O.K., Krulich, L., McCann, S.M. (1978)
The effect of pinealectomy on the pattern of prolactin secretion in conscious freely moving male rats.
Neuroendocrinology 27, 279-290

Rossini, G.P., Liao, Sh. (1982)
Intracellular inactivation, reactivation and dynamic status of prostate androgen receptors.
Biochem. J. 208, 383-392

Rowley, D.R., Chang, Ch.H., Tindall, D.J. (1984)
Effects of sodium molybdate on the androgen receptor from the R 3327 prostatic tumor.
Endocrinology 114, 1776-1783

Sachs, L. (1978)
Angewandte Statistik .
Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Sando, J.J., Hammond, N.D., Stratford, C.A., Pratt, W.B. (1979)
Activation of thymocyte glucocorticoid receptors to the steroid binding form.
J. Biol. Chem. 254, 4779-4789

Schaffner, W., Weissmann, C. (1973)
A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution .
Anal. Biochem. 56, 502-514

Segaloff, A., Steelman, S.L., Flores, A. (1956)
Prolactin as a factor in the ventral prostate assay for luteinizing hormone .
Endocrinology 59, 233-240

Seggie, J., Brown, G.M. (1976)
Twenty-four-hour resting prolactin levels in male rats:

the effect of septal lesions and order of sacrifice.
Endocrinology 98, 1516-1522

Sheridan, P.J., Buchanan, J.M., Anselmo, V.C., Martin, P.M. (1979)
Equilibrium: the intracellular distribution of steroid receptors.
Nature 282, 579-582

Sheridan, P.J., Buchanan, J.M., Anselmo, V.C., Martin, P.M. (1981)
Unbound progesterone receptors are in equilibrium between the nucleus and cytoplasm in cells of the rat uterus.
Endocrinology 108, 1533-1537

Shin, S.H., Aiken, R.B., Roberts, R., Howitt, C. (1974)
Effects of testosterone on serum prolactin in the castrated rat.
J. Endocrinology 63, 257-258

Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A. (1983 a)
Principles of biochemistry. General aspects. Receptors and transport, chap. 14, 289-315.
McGraw-Hill International Book Company
Auckland, London, Sydney, Tokyo, Hamburg

Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A. (1983 b)
Principles of biochemistry. Mammalian biochemistry. Biochemistry of the endocrine systems, part 3, 355-624.
McGraw-Hill International Book Company
Auckland, London, Sydney, Tokyo, Hamburg

Snochowski, M., Pousette, Å., Ekman, P., Bression, D., Andersson, L., Högberg, B., Gustafsson, J.Å. (1977)
Characterization and measurement of the androgen receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma.

J. Clin. Endrocrinol. Metab. 45, 920-930

Spelsberg, Th.C., Halberg, F. (1980)
Circannual rhythms in steroid receptor concentration and nuclear binding in the chick oviduct.
Endocrinology 107, 1234-1244

Sullivan, J.N., Strott, Ch.A. (1973)
Evidence for an androgen-independent mechanism regulating the levels of receptor in target tissue .
J. Biol. Chem. 248, 3202-3208

Taya, K., Igarashi, M. (1974)
Circadian rhythms in serum LH, FSH and prolactin levels in adult male rats .
Endocrinologica Japonica 21, 211-215

Tezón, J.G., Vazquez, M.H., Blaquier, J.A. (1982)
Androgen-controlled subcellular distribution of its receptor in the rat epididymis: 5α-dihydrotestosterone-induced translocation is blocked by antiandrogens .
Endocrinology 111, 2039-2045

Tezón, J.G., Blaquier, J.A. (1983)
Androgens control androgen-binding sites in rat epididymis.
Endocrinology 113, 1025-1030

Toft, D., Gorski, J. (1966)
A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization .
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 55, 1574-1580

Träger, L. (1977)
Steroidhormone .
Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Traish, A.M., Muller, R.E., Wotiz, H.H. (1981)

A new procedure for the quantitation of nuclear and cytoplasmic androgen receptors .
J. Biol. Chem. 256, 12028-12033

Tremblay, R.R., Ho-Kim, M.A., Dubois, R., Dubé, J.Y. (1977)
Mesure du recepteur des androgenes dans le cytosol de la prostate du rat intact: validation d'un essai per echange avec la methyltrienolone.
L'union medicale du Canada 106, 306-312

Unhjem, O., Tveter, K.J., Aakvaag, A. (1969)
Preliminary characterization of an androgen-macromolecular complex from the rat ventral prostate .
Acta Endocrinologica 62, 153-164

Vedeckis, W.V., Freeman, M.R., Schrader, W.T., O'Malley, B.W. (1980)
Progesterone-binding components of chick oviduct: partial purification and characterization of a calcium-activated protease which hydrolyzes the progesterone receptor.
Biochem. 19, 335-343

Velluz, L., Nomine, G., Bocourz, R., Mathieu, J. (1963)
Un analogue triénique de la testosterone.
C. R. Acad. Sci., 257, 569-570

Verhoeven, G., Heyns, W., De Moor, P. (1975)
Ammonium sulfate precipitation as a tool for the study of androgen receptor proteins in rat prostate and mouse kidney.
Steroids 26, 149-167

Wagner, R.K. (1972)
Characterization and assay of steroid hormone receptors and steroid-binding serum proteins by agargel electrophoresis at low temperature .
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1235-1245

Wagner, R.K. (1978)
Extracellular and intracellular steroid binding proteins.
Properties, discrimination, assay and clinical application.
Acta Endocrinologica Suppl. 218, 1-73

Wagner, R.K., Gaues, J. (1972)
Arbeitsanleitung für Steroidrezeptorbestimmung im menschlichen Mammacarcinom.
Institutsinterne Arbeitsanleitung des Max-Planck-Institutes für Zellbiologie, Wilhelmshaven

Wagner, R.K., Jungblut, P.W. (1976)
Oestradiol- and dihydrotestosterone receptors in normal and neoplastic human mammary tissue.
Acta Endocrinologica 82, 105-120

Welshons, W.V., Lieberman, M.E., Gorski, J. (1984)
Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors.
Nature 307, 747-749

Westphal, H.M., Beato, M. (1980)
The activated glucocorticoid receptor of rat liver.
Eur. J. Biochem. 106, 395-403

Westphal, U. (1980)
Bindung von Steroidhormonen an Serumproteine.
Vorlesereihe Schering H 8
Pharmaforschung der Schering AG, Berlin, Bergkamen

Willoughby, J.O. (1980)
Pinealectomy mildly disturbs the secretory patterns of prolactin and growth hormone in the unstressed rat.
J. Endocrinology 86, 101-107

Willoughby, J.O., Brazeau, P., Martin, J.B. (1977)
Pulsatile growth hormone and prolactin: effects of (+) butaclamol, a dopamine receptor blocking agent.

Endocrinology 101, 1298-1303

Wilson, E.M., French, F.S. (1976)
Binding properties of androgen receptors. Evidence for identical receptors in rat testis, epididymis, and prostate.
J. Biol. Chem. 251, 5620-5629

Wilson, E.M., French, F.S. (1979)
Effects of proteases and protease inhibitors on the 4.5 S and 8 S androgen receptor.
J. Biol. Chem. 254, 6310-6319

Wurtman, R.J., Axelrod, J., Phillips, L. (1963)
Melatonin synthesis in the pineal gland: control by light.
Science, New York 142, 1071-1073

Yamamoto, K.R., Alberts, B.M. (1976)
Steroid receptors: elements for modulation of eucaryotic transcription.
Ann. Rev. Biochem. 45, 721-746

Zava, D.T., Landrum, B., Horwitz, K.B., McGuire, W.L. (1979)
Androgen receptor assay with methyltrienolon R 1881 in the presence of progesterone receptors.
Endocrinology 104, 1007-1012

Zubay, G. (1983)
Biochemistry. Hormone action, chap. 29, 1103-1136.
Addison-Wesley Publishing Company
Reading, Massachusetts, Menlo Park, California, London, Amsterdam, Don Mills, Ontario, Sydney

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Priv.Doz.Dr.med. Dipl.Biochem. Hans Moeller, Oberarzt der Universitäts-Kinderklinik Tübingen, für die freundliche Überlassung des Themas. Seine Anregungen, sein wissenschaftliches Interesse und seine Geduld haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.
Dank schulde ich auch Herrn Prof.Dr. Derek Gupta, Direktor der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten an der Universitäts-Kinderklinik Tübingen (Ärztl. Direktor Prof.Dr. Jürgen Bierich), für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.
Frau Barbara Goecke und Herrn Dipl.Phys. Wolfgang Daunke möchte ich dafür danken, daß sie die Laborarbeit mit manchem nützlichen Hinweis erleichtert haben.
Mein Dank gilt ferner Sabine Huber, die mitgezeichnet und beim Besorgen von Literatur geholfen hat.
Zahlreiche Anregungen verdanke ich Herrn Günter Oettling, wissenschaftlicher Assistent am Anatomischen Institut Tübingen.
Für das Lesen der Korrekturen danke ich Beate Weingardt und Reiner Brendle.
Das Tippen besorgte Frau Karin Kneis, die mir damit viel Mühe ersparte.

Lebenslauf

Am 28.04.1955 wurde ich, Wolfgang Dieter Stern, als Sohn der Eheleute Hieronymus und Klara Stern, geb. Hall, in Deisslingen/Württemberg geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Deisslingen wechselte ich auf das altsprachliche Gymnasium in Rottweil, wo ich am 19.06.1974 die Reifeprüfung ablegte.

Im Anschluß an die Schule absolvierte ich als Sanitätssoldat den Wehrdienst.

Vom Wintersemester 1975/76 an studierte ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zunächst Biochemie und erhielt am 31.03.1978 das Vordiplom.

Im Wintersemester 1977/78 begann ich in Tübingen das Studium der Humanmedizin und bestand am 17.10.1984 im Städtischen Krankenhaus Friedrichshafen den 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
Die Approbation wurde mir am 26.10.1984 erteilt.

Seit dem 18.03.1985 arbeite ich als Assistenzarzt an der Rheumaklinik Bad Wurzach bei Professor Dr. E. Jacobi.